

**Beeinflussung der Spermatozoenpenetration
durch Komponenten des
Kallikrein-Kinin-Systems**

Gerhard Preissler

1980

Aus der Inneren Augenheilkunde und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Braun-Pfand

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. O. Braun-Falco

Beeinflussung der Spermatozoenpenetration durch Komponenten
des Kallikrein-Kinin-Systems

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gerhard Preissler

aus München

1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. W.-B. Schill
Mitberichterstatter: Prof. Dr. O. Braun-Falco
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1980



INHALTSVERZEICHNIS

	Seitenzahl
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Material und Methoden</u>	5
2.1. Humansperma	5
2.2. Spermatozoenmotilität	5
2.2.1. Bestimmung der Spermatozoenmotilität in der Zählkammer	5
2.2.2. Zervixmukus-Penetrationstests	6
2.3. Statistische Auswertung	6
2.4. Versuchsanordnung	7
2.5. Substanzen	8
3. <u>Ergebnisse</u>	10
3.1. Einfluß verschiedener Bradykinin-Konzentrationen auf die Motilität seminalplasmafreier Spermatozoen	10
3.2. Einfluß von Bradykinin auf das Penetrationsvermögen der Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus	13
3.2.1. Verbesserung des Penetrationsvermögens	13
3.2.1.1. Nativsperma	13

3.2.1.1.1.	Bradykinin-Konzentration: 10 ng/ml	15
3.2.1.1.2.	Bradykinin-Konzentration: 10, 1, 0,1, und 0,01 ng/ml	15
3.2.1.1.3.	Bradykinin-Konzentration: 1000, 100, 10 und 1 ng/ml	21
3.2.1.2.	Seminalplasmafreie Spermatozoen	27
3.2.1.2.1.	Bradykinin-Konzentration: 10 und 1 ng/ml	27
3.2.1.2.2.	Bradykinin-Konzentration: 1000, 100 und 10 ng/ml	30
3.2.2.	Aufhebung der Bradykinin- Wirkung durch Kininasen	34
3.3.	Einfluß von Kininogen und Kallikrein auf das Penetrations- verhalten gewaschener Spermatozoen	36
3.4.	Verbesserung des Penetrations- vermögens der Spermatozoen durch Kallikrein und Akrosin	44
3.5.	Einfluß von Kallikrein und Coffein auf die Penetrationsfähigkeit von Kryosperma	49
3.6.	Einfluß von Kallikrein und Coffein auf die Penetrationsfähigkeit von Nativsperma	54

4. <u>Diskussion</u>	59
5. <u>Zusammenfassung</u>	82
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	84

1. Einleitung

Der Cervix uteri und dem in den Zervixkrypten in Abhängigkeit von der hormonellen Situation produzierten Zervixmukus kommt eine entscheidende Rolle bei der Spermatozoenpenetration und damit beim Befruchtungsvorgang zu (Schill, 1974a; Schill und Preissler, 1977). Dies wird unter anderem durch Untersuchungen von Ulstein (1973) belegt, der eine Korrelation zwischen der Spermatozoenpenetration im ovulatorischen Zervixsekret und der Konzeptionsrate feststellte.

Eine einfache klinische Untersuchungsmethode zur Objektivierung des Penetrationsverhaltens der Spermatozoen in vivo stellt der sogenannte Postcoitaltest (Sims-Huhner-Test) dar. Ein pathologischer Sims-Huhner-Test kann entweder durch einen Zervixfaktor, einen männlichen Faktor oder durch beides bedingt sein. Ein männlicher Faktor wird häufig durch eine reduzierte Spermatozoenbeweglichkeit unterschiedlichster Genese verursacht. In diesem Fällen ist die Verbesserung der Spermatozoenmotilität ein wichtiges therapeutisches Ziel in der Behandlung des kinderlosen Ehepaares.

Ist eine kausale Therapie der Motilitätsstörung nicht möglich, so kann versucht werden, durch Zusatz verschiedener Substanzen wie z.B. Arginin oder Coffein über eine Aktivierung des Spermatozoenstoffwechsels eine Motilitätssteigerung zu erzielen (Haesungcharern und Chulavatnatol, 1973; Schoenfeld et al., 1973; Keller und Polakoski, 1975). Experimentelle Untersuchungen in den letzten Jahren zeigen, daß auch Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems die Spermatozoenbeweglichkeit günstig beeinflussen können. Die Anregung dazu kam von Fixon et al. (1971), die bei der Ratte durch intraperitoneale Applikation von Kallikrein die mitotische Aktivität von Thymus- und Knochenmarkszellen beträchtlich stimulieren konnten. Rohen und Peterhoff (1973) fanden, ebenfalls an Ratten, unter Zufuhr von Kallikrein einen signifikanten Anstieg des mitotischen Index der Mucosazellen in Duodenum und Jejunum. Zum Nachweis eines möglicherweise auch auf die Zellen des menschlichen Organismus ausgeprägten proliferationsfördernden Effektes wurden Pilotstudien mit Kallikrein am Modell der Spermato-genese durchgeführt (Stüttgen, 1973). Dabei konnte bei einigen Patienten mit Oligozoospermie eine Verbesserung der Spermatozoenzahl beobachtet werden. Die proliferationsfördernde Wirkung des Kallikrein auf die Spermatogenese konnte inzwischen von zahlreichen Autoren bestätigt werden (Schill et al., 1974, 1976a; Hofmann et al., 1975;

Leidl et al., 1975; Schirren, 1975, Schirren et al., 1975; Wallner et al., 1975; Kienitz und Schill, 1977). Als zusätzlicher Effekt konnte eine Verbesserung der Spermatozoenmotilität in Fällen mit Asthenozoospermie und Oligoasthenozoospermie beobachtet werden (Schill, 1975; Lunglmayr, 1976; Kienitz und Schill, 1977; Tauber et al., 1977).

Kallikrein ist ein proteolytisches Pankreasenzym, das in Anwesenheit von Kininogen Kallidin, ein aus 10 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, freisetzt. Dieses Kinin ist der spezifische Effektor der Kallikreinwirkung, Außer dem Kinin Kallidin werden noch Bradykinin und Methionyl-Kallidin unterschieden, die alle eine potente pharmakologische Wirkung entfalten.

Bis heute ist jedoch nicht geklärt, welches Enzym unter physiologischen Bedingungen für die Freisetzung von Kininen im Genitaltrakt verantwortlich ist. Außer Kallikrein können auch andere Kininogenasen diese Funktion übernehmen. Palm und Fritz (1975) konnten zeigen, daß das in der Kopfkappe der Spermatozoen vorkommende trypsinähnliche Enzym Akrosin in der Lage ist, aus Kininogen pharmakologisch aktive Kinine freizusetzen. Akrosin scheint außerdem eine Schlüsselfunktion bei der Penetration der Spermatozoen durch die Zona pellucida der Eizelle zu spielen (Zaneveld et al., 1969).

Zervixmukuspenetrationsversuche in Anwesenheit von Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems wurden bereits früher durchgeführt (Wallner et al., 1975; Schill et al., 1976). Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu prüfen, ob durch die lokale Anwendung von Kininen bzw. des kininfreisetzenden Pankreasenzym Kallikrein (EC 3.4.21.8) Ansatzpunkte bestehen würden, in geeigneten Fällen den topischen Zusatz von Kallikrein zu Sperma in Kombination mit der instrumentellen Insemination zur Überwindung eines männlichen Sterilitätsfaktors zu empfehlen. Aus diesem Grunde wurde das Zervixmukuspenetrationsverhalten der Spermatozoen von Nativsperma, von gewaschenen Spermatozoen und von Kryosperma in Anwesenheit von Kallikrein bzw. Kininen studiert.

Neben Kallikrein sollten weitere Untersuchungen den Einfluß von Akrosin auf die Penetrationsfähigkeit der Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus zeigen. Akrosin ist in seiner Funktion als Kininogenase durch die Möglichkeit der Kininlibrierung für die Stimulation der Spermatozoenwanderung im weiblichen Genitaltrakt möglicherweise von größerer Bedeutung (Fritz et al., 1973; Palm und Fritz, 1975).

Schließlich sollte in einigen orientierenden Experimenten die Wirkung von Coffein auf die Verbesserung der Spermatozoenbeweglichkeit im Zervixsekret geprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Humansperma

Die Untersuchungen wurden mit 180 Ejakulaten verschiedenster Spermaqualität (Normozoospermie, Oligozoospermie, Asthenozoospermie) durchgeführt.

Seminalplasmafreie Spermatozoen wurden durch 2-maliges Waschen (600 g, 2 x 5 min., 22°C) in Lindholmer-Lösung (Lindholmer, 1973), jedoch ohne Zusatz von Albumin, gewonnen. Nach Entfernung des Seminalplasmas wurden die Spermatozoen in Lindholmer-Lösung resuspendiert und bei Zimmertemperatur bis zum Versuch aufbewahrt.

Kryosperma wurde durch Tiefgefrieren von frisch gewonnenem Sperma in flüssigem Stickstoff (-196°C) angelegt. Methodische Einzelheiten siehe Schill (1974b).

2.2. Spermatozoenmotilität

2.2.1. Bestimmung der Spermatozoenmotilität in der Zählkammer

Die Bestimmung der beweglichen Spermatozoen erfolgte in der Zählkammer nach Neubauer. Dabei wurde zunächst die Gesamtzahl der Spermatozoen errechnet und im Anschluß daran die Zahl der unbeweglichen nach Verdünnung mit Lindholmer-Lösung ohne Albuminzusatz festgestellt. Die Zahl der beweglichen Spermatozoen ergab sich durch Subtraktion der unbeweglichen von der Gesamtzahl.

2.2.2. Zervix-Mukus-Penetrationstests

Ovulatorischer Zervixmukus wurde bei 4 °C aufbewahrt und vor dem Versuch mittels Unterdruck in Kapillaren (Schott) mit einem äußeren Durchmesser von 0,6 mm und einer Länge von 7 cm aufgezogen. Alle Experimente wurden nach dem von Kremer (1965) angegebenen Penetrationstest durchgeführt (Abb. 1). Das Penetrationsverhalten der Spermatozoen wurde durch folgende Parameter charakterisiert:

- a.) Messung der Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 22°C (lineare Penetration).
- b.) Bestimmung der Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld bei 2, 3, 4, 5 und 6 cm Wanderungsstrecke nach einer Inkubationszeit von 20, 60 und 120 min. unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops bei 320-facher Vergrößerung (Penetrationsdichte).

Jeder Zervixmukuspenetrationstest wurde in Doppelbestimmungen ausgeführt.

2.3. Statistische Auswertung

Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem gepaarten t-Test. Die mathematischen Berechnungen von Mittelwerten, Standardabweichungen und mittleren Fehlern der Mittelwerte wurden mit dem Rechner HEWLETT PACKARD, Texas Inst. durchgeführt.

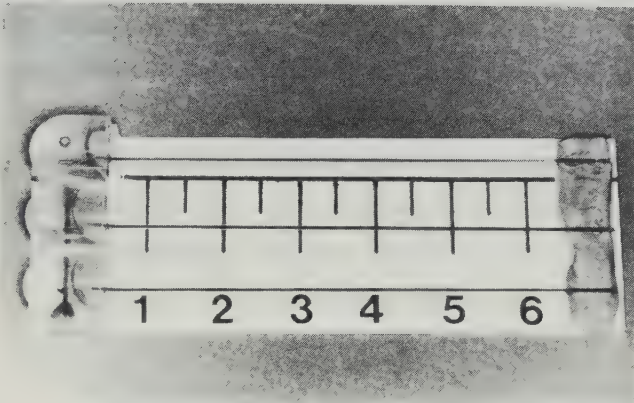


Abb. 1: Spermatzoenpenetrationsmeter nach Kremer (1965). Auf einem Objektträger befindet sich ein Spermareservoir, in das eine horizontal liegende Kapillare eintaucht, die ovulatorischen Zervixmucus enthält. Die Kapillare wird mit Plastilin auf der Gegenseite verschlossen. Die experimentelle Anordnung erlaubt Doppel- und Dreifachansätze. Zu Demonstrationszwecken wurden die Kapillaren mit Farbstoff gefüllt.

2.4. Versuchsanordnung

30 - 90 min. nach der Spermagewinnung wurden die Ejakulate in Portionen zu 0,25 ml aufgeteilt und mit dem gleichen Volumen physiologischer Kochsalzlösung oder Lindholmer-

Lösung vermischt, in denen verschiedene Konzentrationen von Bradykinin enthalten waren. Bei den Zervixmukuspene-
trationstests mit gewaschenen Spermatozoen wurde zu
0,2 ml Sperma 0,05 ml Lindholmer-Lösung mit den ver-
schiedensten Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems
oder mit Akrosin hinzugefügt. Auch bei den Versuchs-
ansätzen mit Coffeinzusatz und bei Verwendung von Kryo-
sperma wurde dieses Mischungsverhältnis gewählt.

Alle Untersuchungen wurden unter Verwendung von
Plastikmaterial oder silikonisiertem Glas ausgeführt.

2.5. Substanzen

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Bradykinin (Sandoz, Schweiz, BRS 640);

hochgereinigtes Schweinepankreas-Kallikrein (Bayer AG,
Leverkusen) spez. Aktivität 1190 Kallikreineinheiten
pro mg (KE/mg);

Carboxypeptidase B (Merck, Darmstadt, Nr. 2300)

Konzentration 2 U/ml;

hochmolekulares Rinderkininogen, hochgereinigt,

(Dr. B. Dittmann, Abteilung für klinische Chemie und
klinische Biochemie in der Chirurgischen Universitäts-
klinik München) 1 mg Kininogen setzte 0,6 µg Bradykinin-
äquivalente im Bioassay nach 30 minütiger Behandlung
mit 10 mg Trypsin frei;

hochgereinigtes Eberakrosin (Dr. W.P. Müller, Abteilung
für klinische Chemie und klinische Biochemie in der
Chirurgischen Universitätsklinik München) spez. Aktivität
13,2 U/mg;

Coffein (Merck, Darmstadt, Nr. 2584) Konzentration 55 mU/ml;

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß verschiedener Bradykininkonzentrationen auf die Motilität seminalplasmafreier Spermatozoen.

Grundlage für die Spermatozoenpenetrationstests im Zervixmukus bildeten Untersuchungen zum Nachweis der Wirkung von Kininen auf die Spermatozoenmotilität, wobei die Zahl der beweglichen Spermatozoen in der Zählkammer bestimmt wurde. Um eine Beeinflussung der Kininwirkung durch Bestandteile des Seminalplasmas zu vermeiden, erfolgten diese Experimente unter Verwendung seminalplasmafreier Spermatozoen.

2 Versuchsansätze mit jeweils 6 Einzelversuchen wurden ausgeführt. In der ersten Versuchsreihe betrug die Bradykinin-Konzentration 1000, 100 und 10 ng/ml, in der zweiten 100, 10 und 1 ng/ml. Der Prozentsatz der beweglichen Spermatozoen ist in Tabelle 1 und 2 dargestellt. Bei beiden Versuchsansätzen zeigte sich eine signifikante Steigerung der Spermatozoenmotilität durch Zusatz von Bradykinin. Die größte Wirkung lag bei einer Bradykinin-Konzentration zwischen 10 und 100 ng/ml.

Tabelle 1:

Verbesserung der Beweglichkeit seminalplasma-freier Spermatozoen durch Zusatz von Bradykinin in Konzentrationen von 1000, 100 und 10 ng/ml. Bei 6 Versuchen wurde nach Inkubationszeiten von 10 min., 1 std. und 4 std. der Prozentsatz der beweglichen Spermatozoen in der Zählkammer bestimmt. In allen Gruppen finden sich gegenüber dem Kontrollwert statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

N = 6	10 min	1 std	2 std	4 std
Kontrolle $\bar{x}$	34,6 %	38,3 %	39,2 %	19,8 %
Standardabw.	$\pm 14,0$	$\pm 18,1$	$\pm 15,4$	$\pm 6,0$
SEM	$\pm 5,7$	$\pm 7,4$	$\pm 6,3$	$\pm 3,0$
Bradykinin 1000 ng/ml $\bar{x}$	59,2 %	56,9 %	57,6 %	39,4 %
Standardabw.	$\pm 9,1$	$\pm 9,4$	$\pm 12,6$	$\pm 15,5$
SEM	$\pm 3,7$	$\pm 3,8$	$\pm 5,1$	$\pm 7,7$
Bradykinin 100 ng/ml $\bar{x}$	62,1 %	52,0 %	50,5 %	45,3 %
Standardabw.	$\pm 5,2$	$\pm 19,2$	$\pm 15,8$	$\pm 11,9$
SEM	$\pm 2,1$	$\pm 7,8$	$\pm 6,3$	$\pm 5,9$
Bradykinin 10 ng/ml $\bar{x}$	57,3 %	59,2 %	58,8 %	37,0 %
Standardabw.	$\pm 8,8$	$\pm 10,6$	$\pm 9,7$	$\pm 13,9$
SEM	$\pm 3,6$	$\pm 4,3$	$\pm 3,9$	$\pm 6,9$

Tabelle 2:

Verbesserung der Beweglichkeit seminalplasma-freier Spermatozoen durch Zusatz von Bradykinin in Konzentrationen von 100, 10 und 1 ng/ml. Bei 6 Versuchen wurde nach Inkubationszeiten von 10 min., 1 std., 2 std. und 4 std. der Prozentsatz der beweglichen Spermatozoen in der Zählkammer bestimmt. In allen Gruppen finden sich gegenüber dem Kontrollwert statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

N = 6	10 min	1 std	2 std	4 std
Kontrolle $\bar{x}$	37,7 %	36,3 %	33,1 %	27,7 %
Standardabw.	$\pm 11,5$	$\pm 9,8$	$\pm 9,7$	$\pm 9,4$
SEM	$\pm 4,7$	$\pm 4,0$	$\pm 3,9$	$\pm 3,8$
Bradykinin 100 ng/ml $\bar{x}$	52,8 %	48,3 %	45,4 %	38,7 %
Standardabw.	$\pm 12,6$	$\pm 8,9$	$\pm 8,1$	$\pm 10,9$
SEM	$\pm 5,1$	$\pm 3,6$	$\pm 3,3$	$\pm 4,4$
Bradykinin 10 ng/ml $\bar{x}$	54,3 %	53,5 %	50,3 %	46,1 %
Standardabw.	$\pm 7,6$	$\pm 5,9$	$\pm 6,9$	$\pm 5,4$
SEM	$\pm 3,1$	$\pm 2,4$	$\pm 2,8$	$\pm 2,2$
Bradykinin 1 ng/ml $\bar{x}$	50,0 %	50,7 %	47,2 %	44,0 %
Standardabw.	$\pm 10,8$	$\pm 8,5$	$\pm 8,0$	$\pm 7,7$
SEM	$\pm 4,4$	$\pm 3,4$	$\pm 3,2$	$\pm 3,1$

Den prozentualen Anstieg der beweglichen Spermatozoen nach Zugabe von verschiedenen Bradykinin-Konzentrationen verdeutlicht Abb.2. Diese Werte wurden ermittelt, indem bei jedem Versuch der Unterschied im Prozentsatz der beweglichen Spermatozoen zwischen Testansatz und Kontrolle bestimmt und daraus der Mittelwert gebildet wurde. Bei dieser Darstellung zeigt sich in beiden Versuchsansätzen eine um 20 - 30 % liegende Steigerung der Spermatozoenmotilität durch Bradykininzusatz.

3.2. Einfluß von Bradykinin auf das Penetrationsvermögen der Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus

3.2.1. Verbesserung des Penetrationsvermögens

3.2.1.1. Nativsperma

Nachdem in der Zählkammer eine Erhöhung der Spermatozoenmotilität seminalplasmafreier Spermatozoen durch Kininzusatz nachgewiesen werden konnte, wurden Spermatozoenpenetrationsversuche mit ovulatorischem Zervixmukus durchgeführt. Ziel dieser Versuchsreihen war es, mit Hilfe des Kapillartests nach Kremer, das Penetrationsverhalten von Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus in Anwesenheit verschiedener Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems zu studieren.

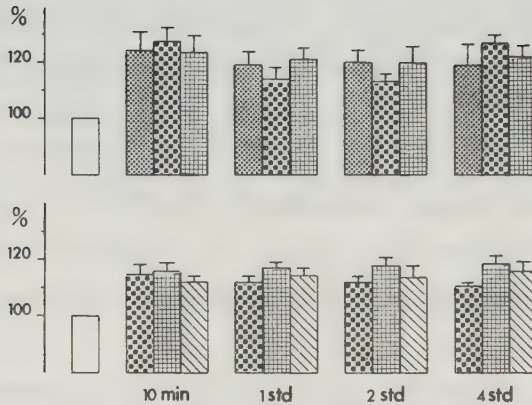


Abb. 2: Motilität seminalplasmafreier Spermatozoen nach Zusatz von Bradykinin. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Steigerung ($\pm$ SEM) der beweglichen Spermatozoen bei jeweils 6 Versuchen nach Inkubationszeiten von 10 min., 1 std., 2 std. und 4 std.

Kontrolle,
 Bradykinin 1000 ng/ml,
 Bradykinin 100 ng/ml,
 Bradykinin 10 ng/ml,
 Bradykinin 1 ng/ml,

3.2.1.1.1. Bradykinin-Konzentration 10 ng/ml

Zunächst wurde in einigen Versuchsansätzen die Wirkung von Bradykinin auf die Penetrationsfähigkeit der Spermatozoen im Zervixsekret untersucht. Nach Zugabe von 10 ng Bradykinin pro ml zu 6 Ejakulaten unterschiedlichster Qualität konnte eine signifikante Steigerung der Spermatozoenwanderung im Zervixmukus gemessen werden (Abb. 3). Die Mittelwerte stellen die Zahl der Spermatozoen pro Gesichtsfeld bei einer Penetrationsstrecke von 3 cm dar.

3.2.1.1.2. Bradykinin-Konzentration 10, 1, 0,1 und 0,01 ng/ml

In weiteren Experimenten wurde der penetrationsfördernde Effekt verschiedener Bradykinin-Konzentrationen untersucht.

Abb. 4 zeigt, daß durch Bradykininzugabe zum Ejakulat eine Steigerung der linearen Penetration beobachtet wird. Dargestellt sind die Mittelwerte von 10 verschiedenen Versuchen. Zusatz von Bradykinin in Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 ng pro ml Sperma führte zu einem signifikanten Anstieg der linearen Penetration im Kremertest. Bei einer Konzentration von 0,01 ng/ml war keine Steigerung mehr zu erkennen.

Ebenso wie die Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoens (lineare Penetration) konnte auch die Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld (Penetrationsdichte)

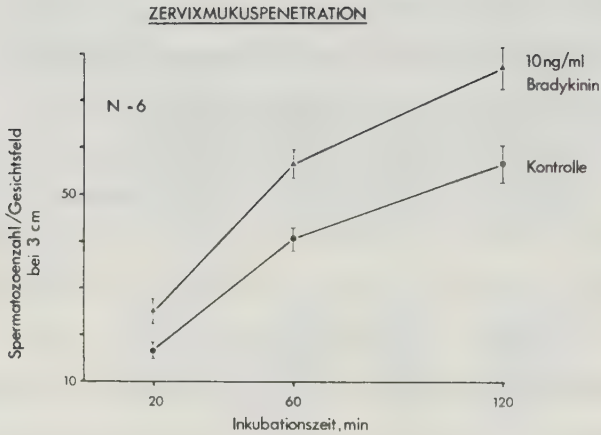


Abb. 3: Stimulation der Spermatozoenpenetration im ovulatorischen Zervixmukus durch Direktzusatz von Kininen. 6 oligozoospermen Ejakulaten wurde jeweils 10 ng Bradykinin pro ml Sperma zugesetzt. Dargestellt ist die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld ($\pm$ SEM) bei 3 cm Wanderungsstrecke im Kremer Kapillartest nach einer Inkubationszeit von 20, 60 und 120 min. bei Raumtemperatur (22°C).

●—● Kontrolle

▲—▲ Bradykinin 10 ng/ml

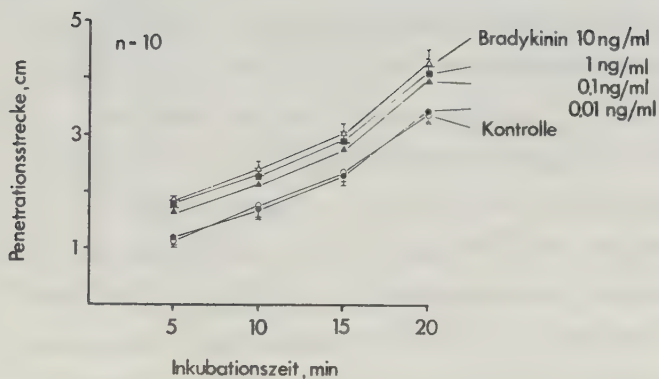


Abb. 4: Zervixmukuspenetrationsvermögen von nativen Spermaproben in Anwesenheit von Bradykinin in Konzentrationen von 10, 1, 0,1 und 0,01 ng/ml. Bestimmung der linearen Penetration nach einer Inkubationszeit von 5, 10, 15 und 20 min.

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| ○—○ Kontrolle | △—△ Bradykinin 10 ng/ml, |
| ■—■ Bradykinin 1 ng/ml, | ▲—▲ Bradykinin 0,1 ng/ml, |
| ●—● Bradykinin 0,01 ng/ml, | |

durch Zugabe von Bradykinin in Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 ng/ml erhöht werden. In Abb. 5 ist die Penetrationsdichte von 6 verschiedenen Ejakulaten aufgetragen. Es ergibt sich eine signifikante Steigerung der Spermatozoenzahl nach Zusatz von 10, 1 und 0,1 ng Bradykinin pro ml Sperma. Der motilitätsstimulierende Effekt war über die ganze Länge der Kapillare zu beobachten (Abb. 6). Keine Verbesserung der Spermatozoenbeweglichkeit zeigte sich bei einer Bradykininkonzentration von 0,01 ng/ml. Die aufgetragenen großen statistischen Schwankungsbreiten ergeben sich bei Verwendung von Absolutzahlen aus der bei jedem Experiment verschiedenen Qualität von Ejakulat und Zervixmukus. Ejakulate und Zervixsekrete von guter Qualität führen zu hohen Spermatozoenzahlen im Penetrationstest nach Kremer, während eine herabgesetzte Qualität niedrige Spermatozoenzahlen bewirkt, so daß sich in der statistischen Auswertung eine große Standardabweichung ergibt. Eine Möglichkeit, diese hohen Schwankungsbreiten zu vermeiden, besteht darin, bei jedem Versuch die Motilitätssteigerung bzw. Motilitätsherabsetzung in Prozent des Kontrollansatzes auszudrücken und die Mittelwerte aus diesen Werten zu bilden.

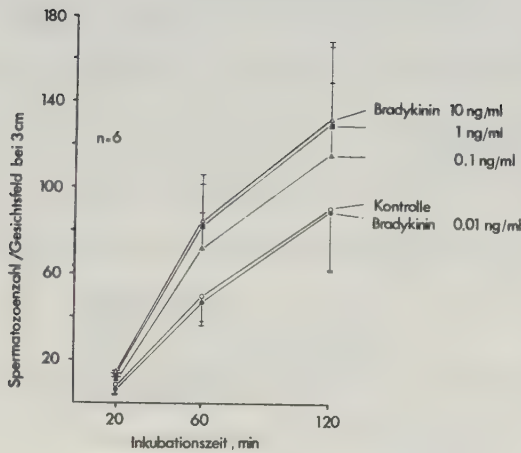


Abb. 5: Verbesserung der Zervixmukuspenetration nativer Spermatozoen nach Zusatz von Bradykinin. Bestimmung der Penetrationsdichte von 6 verschiedenen Ejakulaten nach einer Inkubationszeit von 20, 60 und 120 min. bei einer Wanderungsstrecke von 3 cm.

○-○Kontrolle, △-△BK 10 ng/ml, ■-■BK 1 ng/ml,
▲-▲BK 0,1 ng/ml, ●-●BK 0,01 ng/ml.

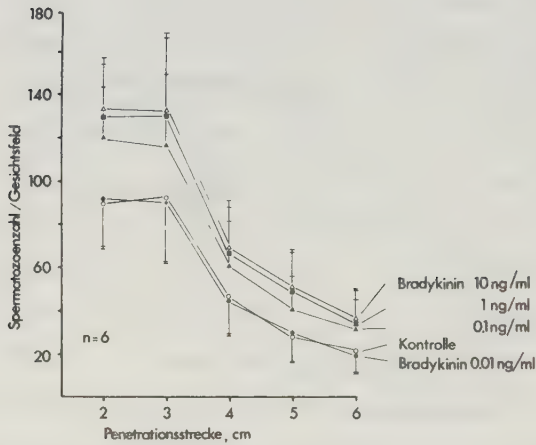


Abb. 6: Migrationsverhalten der Spermatozoen im Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten nach einer Inkubationszeit von 120 min. in Anwesenheit von Bradykinin. Dargestellt sind die Mittelwerte der Penetrationsdichte ($\pm$ SEM) von 6 Versuchen.

○—○ Kontrolle, △—△ BK 10 ng/ml, ■—■ BK 1 ng/ml,
▲—▲ BK 0,1 ng/ml, ●—● BK 0,01 ng/ml.

Die Steigerung der Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld nach 120 min. Inkubation mit Bradykinin in Konzentrationen von 10, 1, 0,1 und 0,01 ng/ml ist in Abb. 7 auf diese Weise dargestellt. Es ergibt sich eine Erhöhung der Penetrationsdichte zwischen 50 und 100 % bei diesen Versuchen. Der prozentual stärkere Anstieg bei einer Wanderungsstrecke von 5 und 6 cm ist durch die geringere Spermatozoenzahl in diesem Bereich der Kapillare bedingt.

3.2.1.1.3. Bradykinin-Konzentration 1000, 100, 10 und 1 ng/ml

Neben Bradykinin-Konzentrationen von 10, 1, 0,1 und 0,01 ng/ml wurden auch Konzentrationen von 1000, 100, 10 und 1 ng pro ml Sperma untersucht. In Tabelle 3 sind die mittleren Spermatozoenzahlen pro Gesichtsfeld von 10 verschiedenen Experimenten aufgetragen. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Penetrationsdichte in den Testansätzen gegenüber den Kontrollen.

Weitere Versuche ergaben, daß die Bradykinin-Konzentration mit der größten Wirkung im Bereich von 10 ng pro ml Sperma liegt (Abb. 8). Bei 10 ng Bradykinin pro ml Sperma war die Spermatozoenzahl im Testansatz um 68 % höher als in der Kontrolle. Konzentrationen unter 0,1 ng/ml zeigten keinen Effekt, während bei Konzentrationen über 100 ng/ml keine weitere Steigerung mehr erfolgte, vielmehr ein Plateau erreicht war.

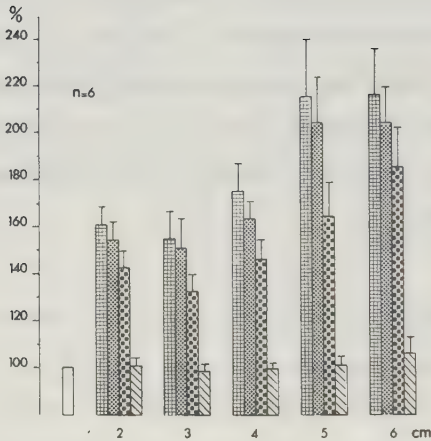


Abb. 7: Penetrationsvermögen der Spermatozoen von Nativ-ejakulaten im ovulatorischen Zervixmucus nach Zusatz von Bradykinin. Angegeben ist die mittlere prozentuale Steigerung ($\pm$ SEM) der Penetrationsdichte von 6 Versüchen bei verschiedenen Wanderungspunkten.

Kontrolle,
 BK 10 ng/ml,
 BK 1 ng/ml,
 BK 0,1 ng/ml,
 BK 0,01 ng/ml.

Tabelle 3:

Verbesserung der Spermatozoenpenetration

von Nativejakulaten durch ovulatorischen Zervixmucus nach Zusatz von Bradykinin in Konzentrationen von 1000, 100, 10 und 1 ng/ml. Bestimmt wurde die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld bei 10 Versuchen nach Inkubationszeiten von 20, 60, und 120 min. bei einer Wanderungstrecke von 3 cm. In allen Gruppen finden sich gegenüber dem Kontrollwert statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$).

N = 10	20 min	60 min	120 min
Kontrolle $\bar{x}$	12,2	53,0	76,2
Standardabw.	$\pm 8,4$	$\pm 23,5$	$\pm 48,1$
SEM	$\pm 2,6$	$\pm 7,4$	$\pm 15,2$
Bradykinin 1000 ng/ml $\bar{x}$	22,1	82,7	114,7
Standardabw.	$\pm 11,3$	$\pm 51,0$	$\pm 80,1$
SEM	$\pm 3,5$	$\pm 16,1$	$\pm 25,3$
Bradykinin 100 ng/ml $\bar{x}$	25,4	82,7	121,8
Standardabw.	$\pm 15,2$	$\pm 51,8$	$\pm 90,6$
SEM	$\pm 4,8$	$\pm 16,4$	$\pm 28,6$
Bradykinin 10 ng/ml $\bar{x}$	20,9	84,1	121,7
Standardabw.	$\pm 9,1$	$\pm 46,3$	$\pm 83,7$
SEM	$\pm 2,8$	$\pm 14,6$	$\pm 26,4$
Bradykinin 1 ng/ml $\bar{x}$	15,7	68,8	105,1
Standardabw.	$\pm 7,0$	$\pm 36,5$	$\pm 80,2$
SEM	$\pm 2,2$	$\pm 11,5$	$\pm 25,3$

PENETRATIONSICHTHE IM KREMER - KAPILLARTEST

Inkubationszeit: 60 min

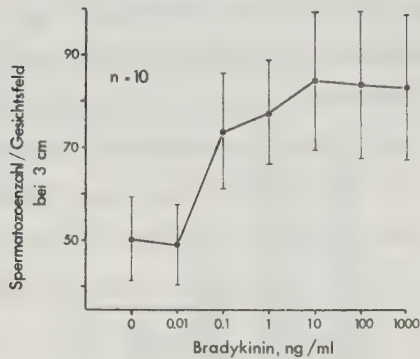


Abb. 8: Wirkung verschiedener Bradykinin-Konzentrationen auf das Zervixmukuspenetrationsvermögen von Spermatozoen. Angegeben sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) von 10 Versuchen bei Verwendung von oligozoospermen Ejakulaten.

Aufgrund der experimentellen Untersuchungen scheinen Kinine vor allem die initiale Phase der Spermatozoenwanderung in den Zervixmukus günstig zu beeinflussen. Messung verschiedener Penetrationsparameter 20, 60 und 120 min. nach Ansetzen eines In vitro-Penetrationstests sprechen für diese Annahme. Aus Abb.9 ist ersichtlich, daß nach einer Beobachtungszeit von 20 min. die Penetrationsgeschwindigkeit am stärksten in den ersten 2 - 3 cm des Kapillarröhrchens gesteigert werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 60 und 120 min. ist dann aber in allen Bereichen

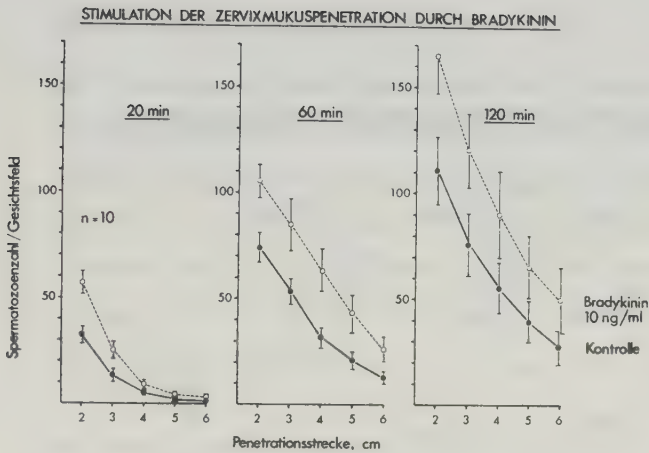


Abb. 9: Migrationsverhalten der Spermatozoen im Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten nach einer Inkubationszeit von 20, 60 und 120 min. Dargestellt sind die Mittelwerte der Penetrationsdichte ($\pm$ SEM) im Kapillartest nach Kremer.

der Kapillare mehr oder weniger gleichmäßig eine signifikante Steigerung der Spermatozoenpenetration durch 10 ng Bradykinin pro ml Sperma zu erkennen. Ähnliche Resultate ergaben sich bei einer Bradykininkonzentration von 100 ng/ml (Abb. 10).

STIMULATION DER ZERVIXMUKUSPENETRATION DURCH BRADYKININ

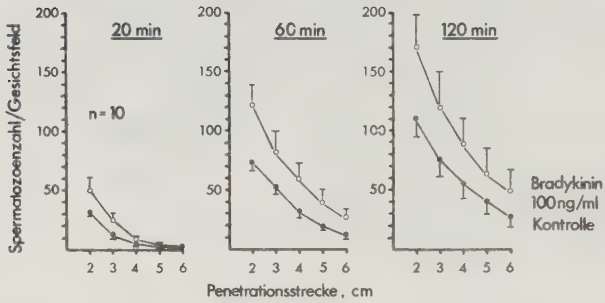


Abb. 10: Migrationsverhalten der Spermatozoen im Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten nach einer Inkubationszeit von 20, 60 und 120 min. (Mittelwerte der Penetrationsdichte $\pm$ SEM)

3.2.1.2. Seminalplasmafreie Spermatozoen

Zur Klärung der Frage, ob die durch Kininogenasen freigesetzten Kinine direkt die Spermatozoenbeweglichkeit stimulieren, oder aber indirekt wirken, z.B. über eine Steigerung der Prostaglandinsynthese oder infolge Reaktion mit anderen Intermediärprodukten, wurden ähnliche Versuche mit seminalplasmafreien Spermatozoen durchgeführt.

In verschiedenen Versuchsansätzen wurde die Wirkung von Bradykinin auf die Penetrationsfähigkeit seminalplasmafreier Spermatozoen im ovulatorischen Zervixsekret untersucht.

3.2.1.2.1. Bradykinin-Konzentration 10 und 1 ng/ml

In Tabelle 4 ist die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld nach Zugabe von Bradykinin in Konzentrationen von 10 und 1 ng/ml Sperma dargestellt. Beide Testansätze unterscheiden sich signifikant von den Kontrollen. Die Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld im Verlauf der ganzen Länge der Kapillare bei Bradykinin-Konzentrationen von 10 und 1 ng pro ml Sperma zeigt Abb. 11. Von 10 Versuchen ist die Penetrationsdichte

Tabelle 4:

Verbesserung des Zervixmukuspenetrations-

vermögens seminalplasmafreier Spermatozoen nach Zusatz von Bradykinin in Konzentrationen von 10 und 1 ng/ml.

Angegeben ist die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld von 10 Versuchen nach Inkubationszeiten von 20, 60 und 120 min. bei einer Wanderungsstrecke von 3 cm. In allen Gruppen finden sich gegenüber dem Kontrollwert statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,005$).

N = 10	20 min	60 min.	120 min
Kontrolle $\bar{x}$	11,5	53,0	75,8
Standardabw.	$\pm$ 8,0	$\pm$ 29,4	$\pm$ 41,5
SEM	$\pm$ 1,7	$\pm$ 6,5	$\pm$ 9,2
Bradykinin			
10 ng/ml $\bar{x}$	21,8	74,2	104,7
Standardabw.	$\pm$ 15,5	$\pm$ 39,0	$\pm$ 51,7
SEM	$\pm$ 3,4	$\pm$ 8,7	$\pm$ 11,5
Bradykinin			
1 ng/ml $\bar{x}$	23,0	66,1	100,3
Standardabw.	$\pm$ 15,3	$\pm$ 35,8	$\pm$ 53,2
SEM	$\pm$ 3,4	$\pm$ 8,0	$\pm$ 11,9

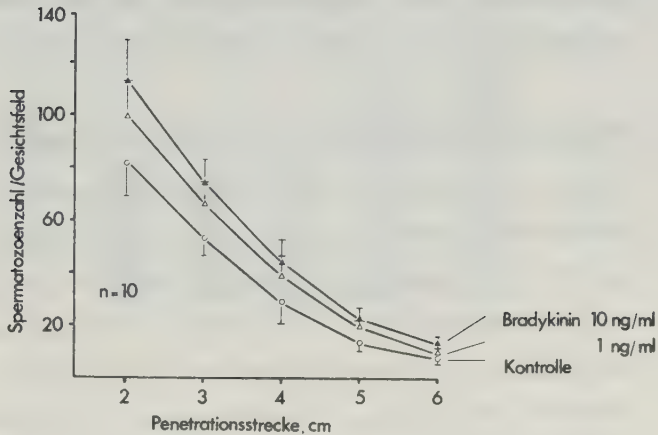


Abb. 11: Penetrationsverhalten von seminalplasmafreien Spermatozoen im Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten nach einer Inkubationszeit von 60 min. Dargestellt sind die Mittelwerte der Penetrationsdichte ($\pm$ SEM) von 10 Versuchen nach Bradykininzusatz.

○-○Kontrolle, ▲-▲BK 10 ng/ml, △-△BK 1 ng/ml.

bei 2, 3, 4, 5 und 6 cm Wanderungsstrecke angegeben. Auch dabei ist ersichtlich, daß, wie bei den Versuchen mit Nativsperma, die Penetrationsfähigkeit der Spermatozoen durch Bradykininzusatz am deutlichsten am Beginn des Kapillarröhrchens gesteigert wird.

3.2.1.2.2. Bradykinin-Konzentration 1000, 100 und 10 ng/ml

Ähnliche Ergebnisse wie bei Bradykinin-Konzentrationen von 10 und 1 ng/ml zeigten sich bei Zusatz von 1000, 100 und 10 ng pro ml Sperma. Die Steigerung der Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld in Prozent bei Bradykinin-Konzentrationen von 1000, 100 und 10 ng/ml ist in Abb. 12 aufgetragen. Durch diese Art der Darstellung können, wie früher ausgeführt, die Qualitätsunterschiede von Ejakulat und Zervixmukus eliminiert werden. Unter den Versuchsbedingungen ergibt sich eine statistisch signifikante, zwischen 50 und 150 % liegende Erhöhung der Penetrationsdichte.

Ebenso wie die Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld konnte auch bei Verwendung seminalplasmafreier Spermatozoen die Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons nach einer Inkubationszeit von 20 min. durch Zusatz von Bradykinin deutlich gesteigert werden. Bei Bradykinin-Konzentrationen von 1000, 100 und 10 ng/ml erhöhte sich die lineare Penetration um ca. 30 % (Abb. 13).

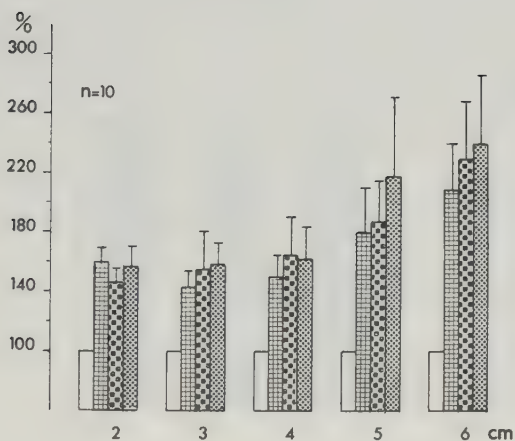


Abb. 12: Zervixmukuspenetrationsvermögen seminalplasmafreier Spermatozoen nach Zusatz von Bradykinin. Es ist die mittlere prozentuale Steigerung ($\pm$ SEM) der Penetrationsdichte von 10 Versuchen bei verschiedenen Wanderungspunkten angegeben.

 Kontrolle,	 BK 1000 ng/ml.
 BK 100 ng/ml,	 BK 10 ng/ml.

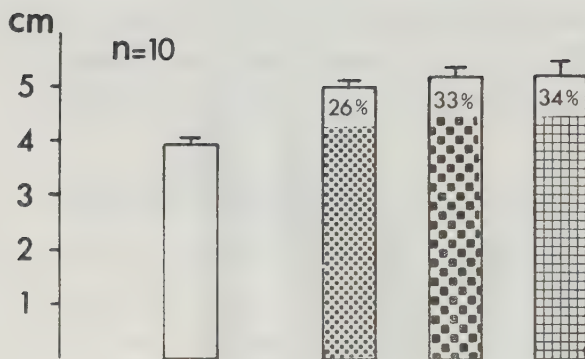


Abb. 13: Bestimmung der Penetrationsstrecke (lineare Penetration) seminalplasmafreier Spermatozoen nach 20 minütiger Inkubationszeit in Anwesenheit von Bradykinin. (Mittelwerte $\pm$ SEM von 10 Versuchen)

 Kontrolle,	 BK 1000 ng/ml,
 BK 100 ng/ml,	 BK 10 ng/ml.

Weitere Versuche mit seminalplasmafreien Spermatozoen zeigten, daß die Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons am stärksten durch Bradykinin-Konzentrationen zwischen 100 und 10 ng pro ml Sperma gesteigert werden konnte (Abb. 14). Dies

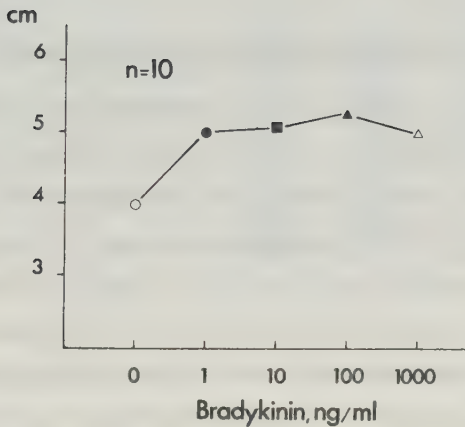


Abb. 14: Wirkung verschiedener Bradykinin-Konzentrationen auf die Penetrationsstrecke seminalplasma-freier Spermatozoen nach 20 minütiger Inkubationszeit. (Mittelwerte von jeweils 10 Versuchen)

- | | |
|------------------|-----------------|
| ○ Kontrolle | ● BK 1 ng/ml, |
| ■ BK 10 ng/ml, | ▲ BK 100 ng/ml, |
| △ BK 1000 ng/ml. | |

stimmt überein mit Befunden, die bei Verwendung von Nativsperma erhoben wurden.

3.2.2. Aufhebung der Bradykininwirkung durch Kininasen

Um deutlich zu machen, daß die Erhöhung der Spermatozoenmotilität spezifisch durch Kinine bedingt ist, wurde zu Ejakulaten gleichzeitig Bradykinin und das kinininaktivierende Enzym Carboxypeptidase B hinzugefügt. Entsprechende Versuche wurden auch mit seminalplasmafreien Spermatozoen durchgeführt. Es zeigte sich, daß der motilitätsstimulierende Effekt von Bradykinin durch Carboxypeptidase B aufgehoben wurde. In Abb. 15 ist die mittlere Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons nach einer Inkubationszeit von 20 min. dargestellt. Während die Motilität der Spermatozoen durch alleinigen Bradykininzusatz gesteigert werden konnte, blieb bei gleichzeitiger Zugabe von Carboxypeptidase B die Penetrationsstrecke im Vergleich zu den Kontrollen nahezu unverändert. Die durch Kininzusatz hervorgerufene geringe Steigerung der linearen Penetration um 13 % reduzierte sich bei Inaktivierung der Kinine durch Carboxypeptidase B auf 5 %.

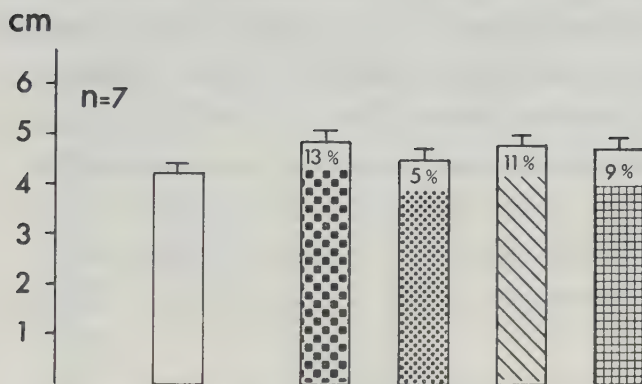


Abb. 15: Zervixmukuspenetrationsvermögen von seminalplasmafreien Spermatozoen in Anwesenheit von Bradykinin und Carboxypeptidase B. Bestimmung der linearen Penetration nach einer Inkubationszeit von 20 min.

Kontrolle,
 BK 10 ng/ml,

 BK 10 ng/ml + Carboxypeptidase B (2U/ml),

 BK 1 ng/ml,
 BK 0,1 ng/ml.

Einen noch eindeutigeren Hinweis auf die spezifische Rolle der Kinine bei der Erhöhung der Spermatozoenmotilität ergab die Bestimmung der Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld. Die mittlere Penetrationsdichte von 11 Versuchen nach einer Inkubationszeit von

120 min. ist in Abb. 16 aufgetragen. Bradykinin wurde in Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 ng/ml zugesetzt. Bei gleichzeitiger Zugabe von 10 ng/ml Bradykinin und Carboxypeptidase B trat eine Verschlechterung der Spermatozoenpenetration bis unter den Kontrollwert ein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Kinine eine spezifische Wirkung im Sinne einer Verbesserung der Spermatozoenbeweglichkeit entfalten.

3.3. Einfluß von Kininogen und Kallikrein auf das Penetrationsverhalten gewaschener Spermatozoen

Im Organismus werden Kinine kontinuierlich durch spezifische Proteinasen freigesetzt. Neben der im Blutplasma vorkommenden Kininogenase Plasma-Kallikrein kommen in den Genitalsekreten noch folgende zur Kininfreisetzung befähigte Proteinase vor: Akrosin aus der Kopfkappe der Spermatozoen und eine Kininogenase aus der Prostata. Auch Proteinase aus Leukozyten werden diskutiert (Greenbaum und Yamafuji, 1966; Heger, 1968). Welche dieser Kininogenasen bei der physiologischen Kininfreisetzung eine Rolle spielt, ist bis jetzt ungeklärt.

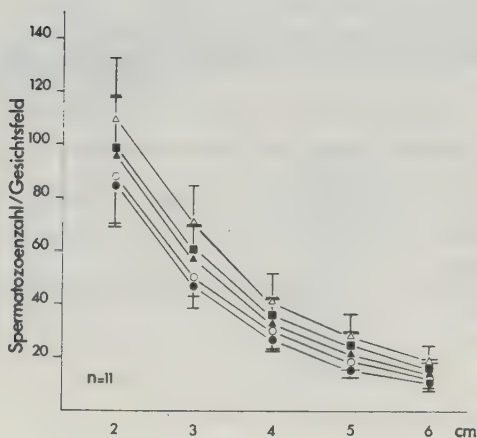


Abb. 16: Migrationsverhalten der Spermatozoen im Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten nach Zusatz von Bradykinin und Carboxypeptidase B. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) von 11 Versuchen nach einer Inkubationszeit von 120 min.

- Kontrolle, △—△ BK 10 ng/ml,
 ●—● BK 10 ng/ml + Carboxypeptidase B (2U/ml),
 ■—■ BK 1 ng/ml, ▲—▲ BK 0,1 ng/ml.

Kinine werden durch im Seminalplasma vorkommende Kininasen relativ schnell wieder abgebaut. Aus diesem Grunde sind Kinine für den therapeutischen Einsatz zur Verbesserung einer herabgesetzten Spermatozoenmotilität weniger geeignet. Durch Kininogenasen werden jedoch im Seminalplasma bei Anwesenheit von Kininogen über einen Zeitraum von einigen Stunden Kinine kontinuierlich freigesetzt. Deshalb empfiehlt es sich, in der Therapie statt der Kinine Kininogenasen zu verwenden.

Um den motilitätsstimulierenden Effekt der Kininogenasen auf die Spermatozoen im Zervixmukus nachzuweisen, wurden nach Zusatz von Kallikrein und dem akrosomalen Penetrationsenzym Akrosin Penetrationsversuche im Kapillartest nach Kremer durchgeführt. Voraussetzung war, daß hochgereinigtes Kininogen dem System hinzugefügt wurde.

Abb. 17 zeigt den Effekt von Kallikrein und Kininogen auf die Spermatozoenmotilität, gemessen am Parameter der linearen Penetration im Zervixmukuspenetrations-test. Die alleinige Zugabe von Kininogen war ohne Wirkung. Kallikrein ohne gleichzeitigen Kininogen-zusatz bewirkte eine Steigerung der Penetrations-

ZERVIXMUKUSPENETRATION GEWASCHENER SPERMATOZOEN

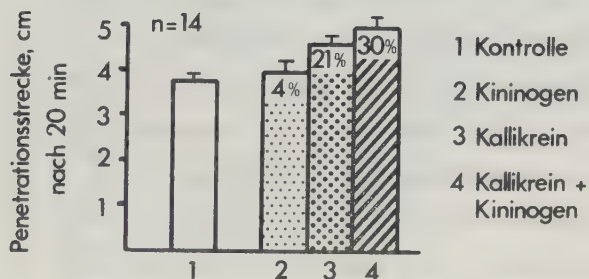


Abb. 17: Bestimmung der Penetrationsstrecke (lineare Penetration) seminalplasmafreier Spermatozoen nach 20 minütiger Inkubationszeit in Anwesenheit von Pankreaskallikrein und Kininogen. (Mittelwerte $\pm$ SEM von 14 Versuchen)

-  Kontrolle,
-  HMW Kininogen (0,17 μ g/ml),
-  Kallikrein (0,7 KE/ml),
-  Kallikrein (0,7 KE/ml) + Kininogen (0,17 μ g/ml).

strecke um 20 %, was dafür spricht, daß wahrscheinlich noch geringe Spuren von Kininogen an der Spermatozoenoberfläche adsorbiert sind, die aus dem Seminalplasma stammen und nur schwer abwaschbar sind. Wurde Kininogen und Kallikrein gleichzeitig zugesetzt, so betrug die Steigerung der Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons 30 %. Noch klarere Verhältnisse lagen bei der Bestimmung der Penetrationsdichte bei einer Wanderungsstrecke von 3 cm vor (Abb. 18). Zusatz von Kallikrein und Kininogen bewirkte eine hochsignifikante Steigerung der Spermatozoenzahl im Kremertest. Bei alleiniger Zugabe von Kallikrein zeigte sich eine geringe Erhöhung der Motilität, während bei alleinigem Kininogenzusatz kein Effekt zu beobachten war. Die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld bei 2, 3, 4, 5 und 6 cm Wanderungsstrecke nach Kallikrein- und Kininogenzugabe ist in Abb. 19 dargestellt. Es ergibt sich eine über die ganze Länge der Kapillare deutlich ausgeprägte Motilitätssteigerung der Spermatozoen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 20 nochmals aufgetragen. Dabei ist, wie schon bei früheren Versuchen, zur Eliminierung von Unterschieden in der Qualität von Ejakulaten und Zervixsekreten, die Erhöhung der Spermatozoenzahl im Testansatz im Vergleich zur Kontrolle in Prozent angegeben. Diese Darstellung

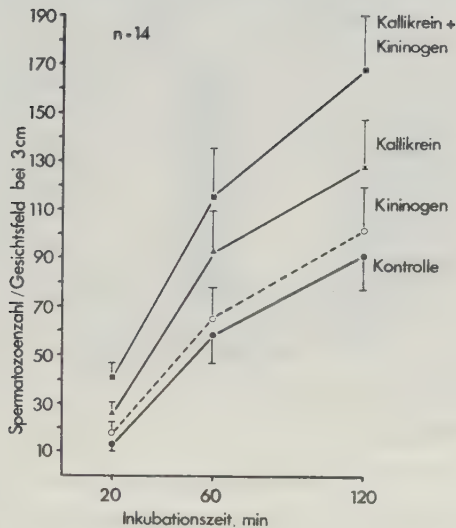


Abb. 18: Verbesserung des Zervixmukuspenetrationsvermögens seminalplasmafreier Spermatozoen nach Zusatz von Kallikrein und Kininogen. Es ist die mittlere Penetrationsdichte ($\pm$ SEM) von 14 Versuchen nach Inkubationszeiten von 20, 60 und 120 min. bei einer Wanderungsstrecke von 3 cm angegeben.

- Kontrolle, ○—○ HMW Kininogen (0,17 μ g/ml),
- ▲—▲ Kallikrein (0,7 KE/ml),
- Kallikrein (0,7 KE/ml) + Kininogen (0,17 μ g/ml).

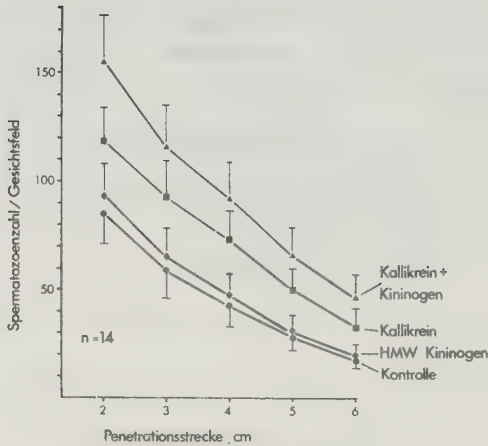


Abb. 19: Penetrationsverhalten seminalplasmafreier Spermatozoen im ovulatorischen Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten in Anwesenheit von Pankreaskalikrein und Kininogen. (Mittelwerte $\pm$ SEM von 14 Versuchen nach 60 minütiger Inkubationszeit)

●—● Kontrolle, ◆—◆ HMW Kininogen (0,17 μ g/ml),
■—■ Kalikrein (0,7 KE/ml), ▲—▲ Kalikrein + Kininogen.

ZERVIXMUKUSPENETRATION GEWASCHENER SPERMATOZOEN

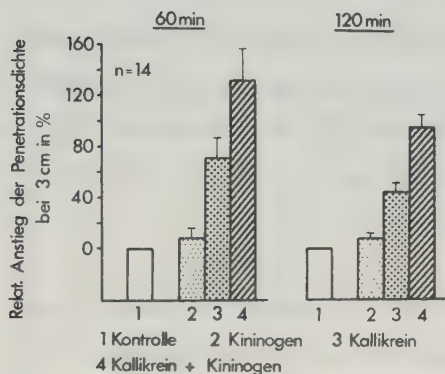


Abb. 20: Zervixmukuspenetrationsvermögen seminal-plasmafreier Spermatozoen nach Zusatz von Kallikrein und Kininogen. Angegeben ist die mittlere prozentuale Steigerung der Penetrationsdichte ($\pm$ SEM) bei 3 cm Wanderungsstrecke von 14 Versuchsansätzen. Die Inkubationszeiten betrugen 60 und 120 min.

- Kontrolle,
 HMW Kininogen (0,17 μ g/ml),
 Kallikrein (0,7 KE/ml),
 Kallikrein (0,7 KE/ml) + Kininogen (0,17 μ g/ml).

ergibt bei gleichzeitigem Kininogen- und Kallikreinzusatz eine Steigerung der Penetrationsdichte bis zu 150 %.

3.4. Verbesserung des Penetrationsvermögens seminal-
plasmafreier Spermatozoen durch Kallikrein und Akrosin

In weiteren Versuchsansätzen wurde die Proteinase Akrosin seminalplasmafreien Spermatozoen zugesetzt. Wiederum mußte gleichzeitig hochgereinigtes Kininogen dem System hinzugefügt werden, um eine Kininfreisetzung zu ermöglichen.

Akrosin ist ein in der Kopfkappe der Spermatozoen vorhandenes trypsinähnliches Enzym, das möglicherweise auch unter physiologischen Bedingungen durch Kininfreisetzung die Spermatozoenmotilität beeinflusst. Es würde somit eine bedeutende Rolle bei der Zervixmukuspenetration der Spermatozoen spielen (Fritz et al., 1973; Palm und Fritz, 1975).

Die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld von 12 Versuchen nach Zusatz von Kininogen und Akrosin bei einer Penetrationsstrecke von 3 cm ist in Abb. 21 dargestellt. Zugabe von Kininogen und Akrosin zu seminalplasmafreien Spermatozoen führte zu einer signifikanten Steigerung der Penetrationsdichte im Kapillartest. Akrosin allein, ohne gleichzeitigen Kininogenzusatz, bewirkte ebenfalls eine deutliche,

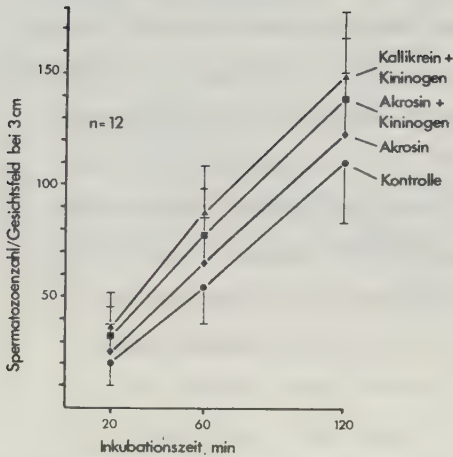


Abb. 21: Verbesserung des Zervixmukuspenetrationsvermögens gewaschener Spermatozoen nach Zusatz von Kininogen, Akrosin und Kallikrein. Es ist die mittlere Penetrationsdichte ($\pm$ SEM) von 12 Versuchen nach Inkubationszeiten von 20, 60 und 120 min. bei einer Wanderungsstrecke von 3 cm dargestellt.

- Kontrolle, ◆—◆ Akrosin (55 mU/ml),
- Akrosin (55 mU/ml) + Kininogen (0,17 μ g/ml),
- ▲—▲ Kallikrein (0,7 KE/ml) + Kininogen (0,17 μ g/ml).

jedoch geringere Erhöhung der Spermatozoenzahl, was wahrscheinlich infolge des Vorkommens geringer Kininogenspuren an der Spermatozoenoberfläche bedingt ist. In Abb. 22 ist die Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld bei verschiedenen Wanderungspunkten nach einer Inkubationszeit von 60 min. aufgetragen. Es zeigt sich, daß die motilitätsstimulierende Wirkung über die ganze Länge der Kapillare anhält. Ebenso wie die Penetrationsdichte konnte auch die Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons nach einer Beobachtungszeit von 20 min. durch Zusatz von Kininogen und Akrosin signifikant gesteigert werden (Abb. 23). Alleinige Zugabe von Akrosin führte ebenfalls zu einer signifikanten Verbesserung der linearen Penetration, die allerdings geringer als bei gleichzeitigem Zusatz von Kininogen war. Zum Vergleich wurde parallel zu den Ansätzen mit Kininogen und Akrosin ein Testansatz mit Kininogen und Kallikreinzusatz ausgeführt. Bei beiden Versuchsansätzen ergaben sich ähnliche Resultate.

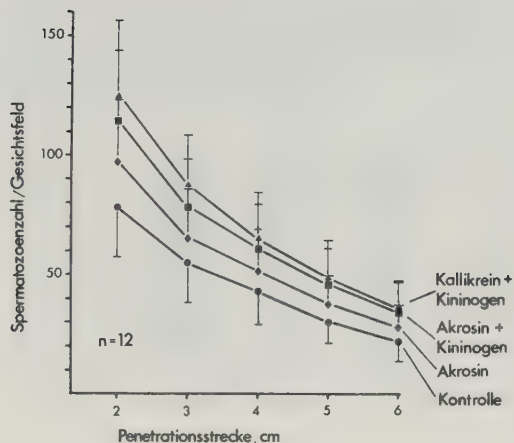


Abb. 22: Migrationsverhalten seminalplasmafreier Spermatozoen im Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten in Anwesenheit von Kininogen, Akrosin und Kallikrein nach einer Inkubationszeit von 60 min. (Mittelwerte $\pm$ SEM von 12 Versuchen)

- Kontrolle, ◆—◆ Akrosin (55 mU/ml),
- Akrosin (55 mU/ml) + Kininogen (0,17 μ g/ml),
- ▲—▲ Kallikrein (0,7 KE/ml) + Kininogen (0,17 μ g/ml).

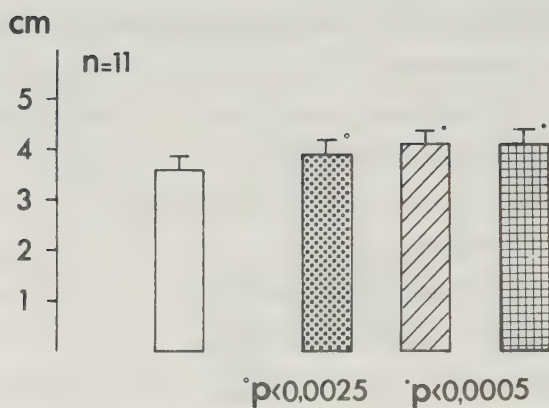


Abb. 23: Bestimmung der Penetrationsstrecke (lineare Penetration) seminalplasmafreier Spermatozoen nach Zusatz von Kininogen, Akrosin und Kallikrein. Angegeben sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) von 11 Versuchen nach einer Inkubationszeit von 20 min.

- Kontrolle,
 Akrosin (55 mU/ml),
 Kininogen (0,17 µg/ml) + Kallikrein (0,7 KE/ml),
 Kininogen (0,17 µg/ml) + Akrosin (55 mU/ml).

3.5. Einfluß von Kallikrein und Coffein auf die Penetrationsfähigkeit von Kryosperma

Die Stimulation der Spermatozoenmotilität durch Kinine ist nicht auf frisch gewonnenes oder über mehrere Stunden gealtertes Sperma beschränkt (Schill und Haberland, 1975). Auch bei Kryosperma läßt sich durch Zusatz von Kallikrein nach dem Auftauprozeß eine Verbesserung der Motilität erreichen (Schill und Pritsch, 1976). Die Möglichkeit der Qualitätsverbesserung von Kryosperma ist deshalb besonders wichtig, da bereits von Fjällbrant und Ackerman (1969) parallel zur Motilitätseinbuße eine starke Herabsetzung der Penetrationsfähigkeit von kryobiologisch behandelten Spermatozoen gefunden wurde, die durch die Alteration der Spermatozoen beim Tiefgefriervorgang bedingt ist. Nachdem Schill und Pritsch (1976) eine signifikante Verbesserung der Spermatozoenmotilität nach Zugabe von Kallikrein zu aufgetauten Kryospermaproben zeigen konnten, wurde das Penetrationsverhalten von kryobiologisch behandelten Spermatozoen nach Kallikrein- und Coffeinzusatz im Zervixmukus studiert.

In Abb. 24 ist die Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons nach einer Inkubationszeit von 20 und 60 min. dargestellt. Zusatz von Kallikrein führte zu einer signifikanten Verbesserung des linearen Penetrationsverhaltens von Kryosperma nach 20 minütiger Inkubationszeit. Nach einer Beobachtungszeit von 60 min. zeigte sich im Kapillartest jedoch nur noch eine geringe Steigerung der Penetrationsstrecke. Gleichzeitig ist eine starke Herabsetzung der Wanderungsstrecke im Vergleich zu früheren Versuchen bei Verwendung von Nativsperma zu beobachten. Dies ist auf eine Schädigung der Spermatozoen durch den Tiefgefriervorgang zurückzuführen.

Ebenso wie die lineare Penetration konnte auch die Penetrationsdichte im Kremertest nach einer Beobachtungszeit von 60 min. durch Kallikreinzusatz signifikant gesteigert werden (Abb. 25). 2 Stunden nach initialem Sperma-Zervixmukuskontakt war jedoch kein Unterschied zu den Kontrollen mehr festzustellen. Dieses Ergebnis, das im Gegensatz zu den Befunden bei Verwendung von Frischsperma steht, ist ebenfalls Ausdruck einer verminderten Vitalität der kältekonservierten Spermatozoen, da infolge des Gefriervorganges mehr oder weniger starke Schädigungen des

ZERVIXMUKUSPENETRATION VON KRYOSPERMA

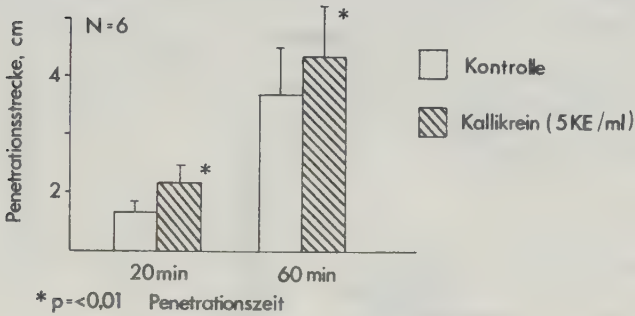


Abb. 24: Zervixmukuspenetrationsvermögen von aufgetauten Kryospermaproben in Anwesenheit von Kallikrein. Bestimmung der linearen Penetration nach einer Inkubationszeit von 60 und 120 min.

□ Kontrolle, ▨ Kallikrein (5 KE/ml).

Spermatozoenstoffwechsels resultieren, die sich unter anderem auch in einer Verminderung der funktionellen Reservekapazität der Samenzellen manifestieren.

ZERVIXMUKUSPENETRATION VON KRYOSPERMA

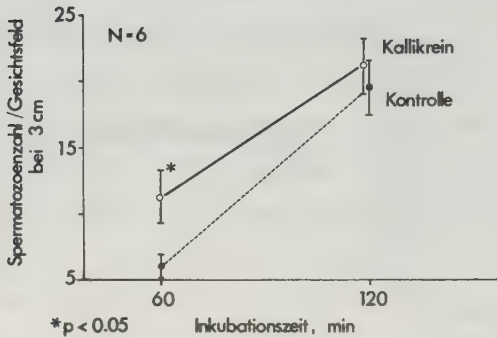


Abb. 25: Zervixmukuspenetration von aufgetauten Kryospermproben in Anwesenheit von Kallikrein. Bestimmung der Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld (Penetrationsdichte) bei 3 cm Wanderungsstrecke nach einer Inkubationszeit von 60 und 120 min.

●—● Kontrolle, ○—○ Kallikrein (5 KE/ml).

Die Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld nach einer Inkubationszeit von 60 und 120 min. ist in Abb. 26 aufgetragen, wobei die Steigerung der Spermatozoenzahl im Testansatz im Vergleich zur Kontrolle in Prozent angegeben wurde. Es konnte eine signifikante

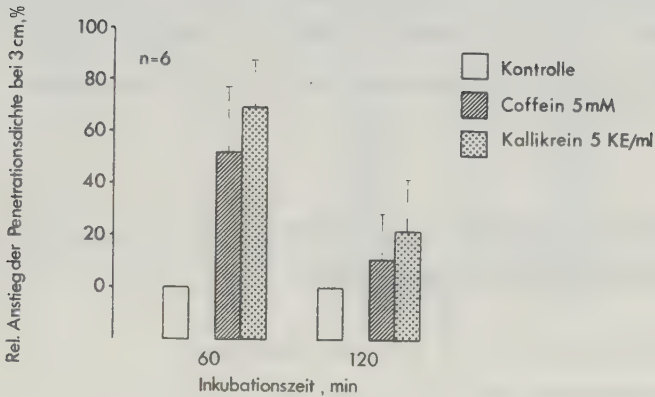


Abb. 26: Zervixmukuspenetrationsvermögen von aufgetauten Kryospermproben in Anwesenheit von Kallikrein und Coffein. Dargestellt ist die mittlere prozentuale Steigerung ($\pm$ SEM) der Penetrationsdichte bei 3 cm Wanderungsstrecke nach einer Inkubationszeit von 60 und 120 min.

□ Kontrolle, ▨ Coffein (5 mM),
 ▩ Kallikrein (5 KE/ml).

Verbesserung der Spermatozoenmotilität durch Kallikrein-zusatz bei einer Inkubationszeit von 60 min. und eine nur geringgradige Erhöhung nach 120 min. beobachtet werden.

3.6. Einfluß von Coffein und Kallikrein auf die Penetrationsfähigkeit nativer Spermatozoen

Schließlich wurde in einigen orientierenden Untersuchungen der Einfluß von Coffein bzw. von Coffein in Anwesenheit von Kallikrein auf das Penetrationsverhalten von nativen Spermatozoen im Zervixmukus untersucht.

Den Effekt von Kallikrein und Coffein auf das Penetrationsvermögen von nativem Ejakulat im Zervixmukus verdeutlicht Abb. 27. Bei 5 Versuchen konnte die Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons nach 20 minütiger Inkubationszeit sowohl durch Kallikrein als auch durch Coffein signifikant gesteigert werden. Die gleichzeitige Zugabe beider Substanzen führte zu einer weiteren Verbesserung der Penetrationsfähigkeit. Bei diesen Versuchsansätzen

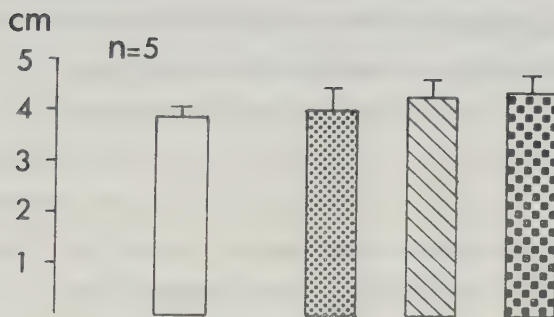


Abb. 27: Zervixmukuspenetrationsvermögen von nativen Spermaproben in Anwesenheit von Kallikrein und Coffein. Bestimmung der linearen Penetration ($\pm$ SEM) nach 20 minütiger Inkubationszeit. ($p < 0,05$)

□ Kontrolle, ▨ Coffein (5 mM),
▤ Kallikrein (5 KE/ml),
▩ Kallikrein (5 KE/ml) + Coffein (5 mM).

ist jedoch keine Aussage darüber möglich, welche Substanz die Penetration der Spermatozoen im Zervixsekret in höherem Maße stimuliert, da die Versuchszahl zu gering ist und sich schon vor Beginn des Penetrations-tests bei der Motilitätsschätzung eine stärkere Steigerung der Beweglichkeit durch Kallikrein ergab.

Ebenso wie die lineare Penetration konnte auch die Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld durch Zusatz von Kallikrein und Coffein verbessert werden (Tabelle 5). Es sind die Mittelwerte von 5 Versuchen nach einer Inkubationszeit von 20, 60 und 120 min. aufgetragen.

Tabelle 5:

Verbesserung der Zervixmukuspenetration von Nativsperma nach Zusatz von Coffein (5 mM) und Kallikrein (5 KE/ml). Bestimmt wurde die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld bei 5 Versuchen nach Inkubationszeiten von 20, 60 und 120 min. bei einer Wanderungsstrecke von 3 cm. In allen Gruppen finden sich gegenüber dem Kontrollwert statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,025$).

N = 5	20 min	60 min	120 min
Kontrolle $\bar{x}$	18,5	56,6	90,4
Standardabw.	$\pm$ 25,0	$\pm$ 23,8	$\pm$ 30,3
SEM	$\pm$ 11,1	$\pm$ 10,6	$\pm$ 13,5
Coffein $\bar{x}$	20,8	65,8	109,2
Standardabw.	$\pm$ 26,7	$\pm$ 29,7	$\pm$ 39,5
SEM	$\pm$ 11,9	$\pm$ 13,2	$\pm$ 17,6
Kallikrein $\bar{x}$	24,2	74,0	109,6
Standardabw.	$\pm$ 28,7	$\pm$ 31,4	$\pm$ 41,8
SEM	$\pm$ 12,8	$\pm$ 14,0	$\pm$ 18,7
Kall./Coff. $\bar{x}$	28,7	89,3	130,8
Standardabw.	$\pm$ 30,7	$\pm$ 45,2	$\pm$ 53,1
SEM	$\pm$ 13,7	$\pm$ 20,2	$\pm$ 23,7

In Abb. 28 ist die mittlere Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld bei verschiedenen Wanderungspunkten nach Kallikrein- und Coffeinzusatz dargestellt. Es ist eine deutliche, über die ganze Länge der Kapillare nachweisbare Steigerung des Penetrationsvermögens der Spermatozoen durch Zugabe von Kallikrein und Coffein ersichtlich. Wie die lineare Penetration konnte auch die Penetrationsdichte durch gleichzeitigen Zusatz von Kallikrein und Coffein weiter verbessert werden.

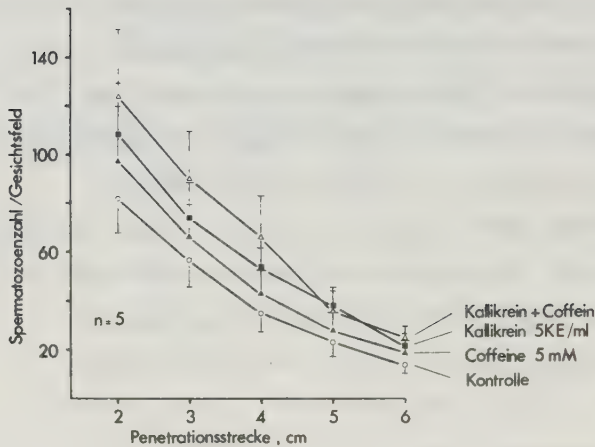


Abb. 28: Migrationsverhalten von Nativsperma im Zervixsekret bei verschiedenen Wanderungspunkten nach Zusatz von Kallikrein und Coffein. Es sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) von 5 Versuchen nach einer Inkubationszeit von 60 min. angegeben.

○—○ Kontrolle, ▲—▲ Coffein (5 mM),
■—■ Kallikrein (5 KE/ml),
△—△ Kallikrein (5 KE/ml) + Coffein (5 mM).

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Effekt des Kallikrein-Kinin-Systems auf das Penetrationsverhalten der Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus zu untersuchen.

Am Kallikrein-Kinin-System (Abb. 29) sind vier Komponenten beteiligt (Schill et al., 1976a):

KALLIKREIN-KININ SYSTEM

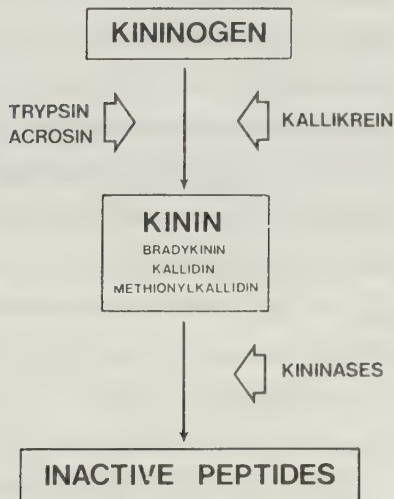


Abb. 29: Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems.
(siehe Schill et al., 1976a)

1. Kininogen

Es ist das spezifische Substrat für Kallikrein. Kininogen wird in der Leber synthetisiert und kommt in einer niedermolekularen und hochmolekularen Form vor.

2. Kininogenasen (Kallikrein, Akrosin) Sie setzen in

Anwesenheit von Kininogen Kinine frei. Beim Pankreaskallikrein handelt es sich um ein Glycoprotein, das in hohen Konzentrationen im Pankreas vorkommt und durch Trypsin aktiviert wird.

Akrosin ist ein in der Kopfkappe der Spermatozoen lokalisiertes trypsinähnliches Enzym, das bei der Penetration der Zona pellucida der Eizelle eine wichtige Rolle spielt, aber auch möglicherweise an der enzymatischen Hydrolyse des Zervixmukus beteiligt ist. Dem Akrosin kommt wahrscheinlich auch als Kininogenase für die Stimulation der Spermatozoenmigration im weiblichen Genitaltrakt eine Bedeutung zu (Fritz et al., 1973; Palm und Fritz, 1975).

3. Kinine

Sie sind die spezifischen Effektoren des Kallikrein-Kinin-Systems. Man unterscheidet das Nonapeptid Bradykinin, das Dekapeptid Angiotensin und Methionyl-Angiotensin.

4. Kininasen Kininasen sind im Blutplasma und in anderen Körperflüssigkeiten vorhanden. Durch diese ubiquitär vorkommenden Enzyme werden Kinine sehr schnell abgebaut.

Die physiologische Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems ist noch immer nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist, daß Kinine zu einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität und zu einer Erweiterung von Arteriolen und Kapillaren führen. Kinine spielen auch bei der Schmerzentstehung eine Rolle und sind vor allem durch die Erregung der glatten Muskulatur, insbesondere von Ileum und Uterus bekannt (Frey et al., 1968; Erdös, 1970). Außerdem besteht eine enge Verknüpfung des Kallikrein-Kinin-Systems mit der Blutgerinnung, der Fibrinolyse und dem Komplement-System durch den Hageman-Faktor (Habermann, 1971; Eisen, 1975). Eine Beteiligung des Kinin-Systems ist bei einer Reihe pathologischer Vorgänge gesichert, vor allem bei Gewebsreaktionen im Verlauf entzündlicher Prozesse, beim hereditären angioneurotischen Ödem (Landermann et al., 1962) und beim Carcinoidsyndrom (Oates et al., 1964). Neuerdings wird auch über einen Einfluß auf die Zellproliferation berichtet (Rixon et al., 1971, 1973; Haberland et al., 1975).

Bei androgen-bedingter Infertilität dominieren meist Motilitätsstörungen (Asthenozoospermie), die mit einer reduzierten Spermatozoenzahl kombiniert sind (Oligoasthenozoospermie). Das Hauptziel einer andrologischen Therapie muß es daher sein, in Fällen, in denen eine kausale Therapie der Fertilitätsstörungen, z.B. die operative Beseitigung einer Varikozele, nicht möglich ist, neben der Normalisierung der Spermatozoenzahl und Spermatozoenmorphologie vor allem die Verbesserung einer pathologisch eingeschränkten Spermatozoenmotilität zu erreichen.

Mehrere Substanzen wie z.B. Albumin, Arginin und Coffein sind in der Lage, die Spermatozoenbeweglichkeit zu verbessern. Die Wirkung von Coffein beruht auf der Hemmung einer spermatozoen-spezifischen Phosphodiesterase und damit auf einem Anstieg des intrazellulären cyclischen AMP's. Ein toxischer Einfluß von Coffein auf die Spermatozoen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Kürzlich gelang der experimentelle Nachweis, daß dem Kallikrein-Kinin-System neben anderen biologischen Systemen (Prostaglandine, Polyamine, zyklische Nucleotide, Acetylcholin) (Sanyal et al., 1971; Eskin et al., 1973; Shah et al., 1976) eine Bedeutung bei der Regulation und

Stimulation der Spermatozoenmotilität zukommt, wahrscheinlich über eine Beeinflussung des cyclischen AMP-Spiegels (Schill, 1975b). Jüngste Untersuchungen weisen auf die Bedeutung der intrazellulären Konzentration von cyclischen AMP für die Stimulation der Spermatozoenmotilität hin (Casillas und Hoskins, 1971; Garbers et al., 1971; Hicks et al., 1972; Tash und Mann, 1973a). Tash und Mann (1973b) konnten zeigen, daß zwischen Spermatozoenmotilität und cAMP-Spiegels eine enge Korrelation besteht. Bei guter Motilität konnten hohe cAMP-Spiegel in den Spermatozoen nachgewiesen werden, bei reduzierter Beweglichkeit war ein signifikanter Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels zu beobachten. Inzwischen wurde gesichert, daß cAMP die enzymatische Aktivität der allosterischen Phosphofruktokinase steuert und damit durch die Beeinflussung der Fructolyse den Spermatozoenstoffwechsel direkt kontrolliert (Hoskins et al., 1971).

In Gestalt von Kallikrein steht so zum erstenmal eine physiologische Substanz zur Verfügung, mit der wahrscheinlich über eine Erhöhung des intrazellulären cyclischen AMP-Spiegels, die Spermatozoenmotilität zu beeinflussen ist.

Die Untersuchungen zur Wirkung des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Spermatozoenmotilität wurden durch Beobachtungen von Rixon et al. (1971) angeregt, die bei Ratten eine Steigerung des Mitoseindex von Knochenmarks- und Thymuszellen fanden. Stüttgen (1973) konnte nach Kurzzeitbehandlung von Männern mit Oligozoospermie eine Erhöhung der Spermatozoendichte durch Kallikrein erzielen. Inzwischen konnte von mehreren Autoren durch systemischen Zusatz von Kallikrein eine Verbesserung von Spermatozoenzahl und Spermatozoenmotilität nachgewiesen werden (Schill, 1975a; Schirren et al., 1975; Tauber et al., 1977). Die Behandlung subfertiler Männer mit Kallikrein führte zu einem signifikanten Anstieg der Spermatozoenzahl drei Monate nach Behandlungsbeginn. Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Beteiligung des Kinin-Systems an den spermatogenetischen Funktionen des menschlichen Hodens hin. Kürzlich konnte diese Annahme durch die klinischen Ergebnisse einer Doppel-Blind-Studie bei Männern mit Oligozoospermie und durch histomorphometrische Untersuchungen bei Ratten weiter gestützt werden (Schill, 1977; Rohen und Buschhüter, 1975; Rohen und Stuttmann, 1977). Es ist jedoch noch immer nicht bekannt, ob die In vitro- und In vivo-beobachteten Wirkungen der Kinine auf Spermatozoenzahl und Spermatozoenmotilität spezifisch sind, oder unspezifisch im Sinne von Verbesserungen der Membranpermeabilität und der Hodendurchblutung.

Die Verbesserung der Motilität der Spermatozoen ist kein direkter Effekt des Kallikrein, sondern beruht indirekt auf der kininfreisetzenden Wirkung des Kallikreins. Der Direktzusatz von Kininen zum Ejakulat führte zu einer signifikanten Motilitätssteigerung, was dafür spricht, daß Kinine die eigentlichen Effektoren der Kallikreinwirkung sind.

Von großer praktischer Bedeutung ist die Frage, ob mit der Stimulation der Motilität auch eine Verbesserung der Zervixmukuspenetration der Spermatozoen verbunden ist. Dies ist deshalb wichtig, weil eine gute Korrelation zwischen der Spermatozoenpenetration im ovulatorischen Zervixsekret und der Konzeptionsrate besteht (Ulstein, 1973).

Das Hauptgewicht der vorliegenden Arbeit wurde deshalb auf die Untersuchung des Penetrationsverhaltens der Spermatozoen im Kapillartest nach Kremer gelegt. Die Wirkung von Kallikrein bzw. Kininen konnte so unter annähernd physiologischen Bedingungen studiert werden. Lediglich zur Orientierung wurden zu Beginn der Untersuchungen Versuche in der Zählkammer unternommen mit Bestimmung der Anzahl der beweglichen Spermatozoen.

Zusatz von Bradykinin im Nanogramm-Bereich führte zu einem signifikanten Anstieg der beweglichen Spermatozoen über einen Zeitraum von vier Stunden. Auch im Kremertest zeigte sich eine deutliche Erhöhung des Penetrationsvermögens der Spermatozoen nach Zugabe von Bradykinin. Sowohl bei Nativ-ejakulaten als auch bei seminalplasmafreien Spermatozoen war es möglich, die Penetrationsstrecke des schnellsten Spermatozoons und die Spermatozoenzahl pro Gesichtsfeld signifikant zu steigern. Die Kininwirkung konnte durch gleichzeitigen Zusatz einer Kininase, z.B. Carboxypeptidase B, verhindert werden. Alleiniger Zusatz von Carboxypeptidase B zu Ejakulaten mit guter Motilität führte sogar zu einem signifikanten Abfall der Spermatozoenmotilität (Schill, 1975b; Schill und Haberland, 1975).

In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von Kallikrein auf die Penetrationsfähigkeit von Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus untersucht. Es ergab sich dabei eine deutliche Steigerung der Spermatozoenpenetration im Zervixsekret. Der Nachweis, daß die beobachtete Motilitätssteigerung auf die enzymatische Aktivität des Kallikreins zurückzuführen war, konnte durch Inaktivierung des Enzyms mit Aprotinin (Trasyloi^R) geführt werden (Schill und Haberland, 1975). Kürzlich bestätigten Steiner et al. (1977)

die stimulierende Wirkung des Kallikreins auf die Spermatozoenbeweglichkeit. Sie bestimmten mit Hilfe der Laser-Doppler-Spektroskopie die Geschwindigkeit der Spermatozoen nach Kallikreinzusatz. Durch diese Untersuchungen wurde objektiv eine Motilitätsverbesserung durch Kallikrein nachgewiesen.

Auch bei Kryosperma ließ sich das Zervixmukuspentrationsvermögen durch Zusatz von Kallikrein und Coffein deutlich verbessern.

Die Kryokonservierung von menschlichen Spermatozoen in flüssigem Stickstoff ist mit einer erheblichen Herabsetzung der Spermatozoenvitalität und demzufolge mit einer Verminderung der Konzeptionsrate verbunden. Deshalb ist es von großer praktischer Bedeutung, die Beweglichkeit der Spermatozoen nach dem Wiederauftauprozess zu verbessern. Schill und Pritsch (1976) konnten eine Erniedrigung des Spermatozoenstoffwechsels bei kryobiologisch behandelten Spermaproben nachweisen. Bei tiefgefrorenen und wiederaufgetauten Spermatozoen war der Fruktoseverbrauch im Vergleich zu Frischsperma deutlich herabgesetzt. Durch Zusatz von Kallikrein und Coffein konnte eine signifikante Steigerung der Fruktolyse und damit des Spermatozoenmetabolismus erzielt werden. Ebenso ließ sich die Motilität der Spermatozoen erheblich verbessern.

Auch im Zervixmukuspenetrationstest nach Kremer zeigte sich eine signifikante Steigerung sowohl der linearen Penetration nach einer Inkubationszeit von 20 min. als auch der Penetrationsdichte nach 60 min. Nach längeren Inkubationszeiten konnte kein Unterschied zu den Kontrollen mehr festgestellt werden, was eventuell durch einen beschleunigten Zusammenbruch des Spermatozoenstoffwechsels durch den Tiefgefriervorgang bedingt ist. Die beste Stimulation konnte durch gleichzeitigen Zusatz von Kallikrein und Coffein erzielt werden. Dies stimmt überein mit Befunden bei Verwendung von Frischsperma (Schill, 1975c).

Der genaue Mechanismus der Kininwirkung ist bis jetzt ungeklärt. Palm et al. (1976) diskutierten eine Erhöhung des intrazellulären cyclischen AMP's durch Kinine infolge einer Stimulation der Prostaglandinsynthese. Versuche mit seminalplasmafreien Spermatozoen ergaben eine Verbesserung der Penetrationsfähigkeit durch alleinigen Kininzusatz. Obwohl somit ein direkter Kinineffekt auf die Spermatozoenmotilität nachgewiesen werden konnte, kann eine zusätzliche indirekte Kininwirkung, wie die oben beschriebene Aktivierung der Prostaglandinsynthese, nicht ausgeschlossen werden. Eine direkte Stimulation der Adenylcyclase

und damit eine Erhöhung des cyclischen AMP-Spiegels der Spermatozoen durch Kininzusatz wurde bereits von mehreren Autoren diskutiert (Casillas und Hoskins, 1971; Garbers et al., 1971; Hicks et al., 1972; Tash und Mann, 1973a). Cyclisches AMP steuert die enzymatische Aktivität der allosterischen Phosphofruktokinase und kontrolliert damit durch die Beeinflussung der Fruktolyse direkt den Spermatozoenstoffwechsel (Hoskins et al., 1971).

Auch Coffein bewirkt eine Anhebung des cyclischen AMP-Spiegels, allerdings über einen anderen Mechanismus, nämlich die Hemmung des cAMP inaktivierenden Enzyms, der Phosphodiesterase (Abb. 30).

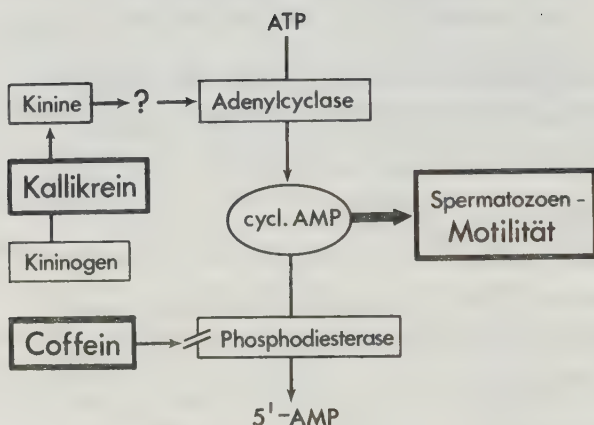


Abb. 30: Schema zur Regulation der Spermatozoenmotilität. Stimulation der Spermatozoenmotilität über eine Erhöhung des intrazellulären cyclischen AMP-Spiegels:

- a.) durch Hemmung des inaktivierenden Enzyms
Phosphodiesterase durch Methylxantine (z.B. Coffein) und
- b.) hypothetisch: durch indirekte Stimulation der Adenylcyclase durch Kinine (z.B. durch das Kinin-freisetzende Enzym Kallikrein) (siehe Schill, 1976c).

Theoretisch müßte somit durch gleichzeitigen Zusatz von Kallikrein und Coffein eine stärkere Stimulation des Spermatozoenmetabolismus erzielt werden, als durch Zugabe von nur einer Substanz. Dies konnte durch Versuche mit gleichzeitigem Kallikrein- und Coffeinzusatz bestätigt werden.

Eine Verbesserung des Zervixmukuspenetrationsvermögens der Spermatozoen durch Kallikrein bzw. Kinine setzt eine Steigerung des Spermatozoenstoffwechsels voraus. Letzteres konnte durch einen gesteigerten Fruktoseverbrauch (Fruktolyse), der parallel zur Motilitätssteigerung erfolgte, objektiviert werden. (Schill, 1975d). Auch eine signifikante Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs kallikreinstimulierter Spermatozoen konnte nachgewiesen werden (Leidl et al., 1975). Dies zeigt, daß Kallikrein eine Anregung des Spermatozoenstoffwechsels bedingt. Ein weiterer Hinweis, daß Kallikrein bzw. Kinine den Spermatozoenmetabolismus aktivieren, erlaubte die Bestimmung des intrazellulären Spiegels von cyclischen AMP. In vorläufigen Studien konnte eine signifikante Erhöhung des cyclischen AMP-Spiegels der Spermatozoen gemessen werden (Schill, 1977).

Wenn das Kallikrein-Kinin-System physiologisch an der Regulation der Spermatozoenbeweglichkeit und Spermatozoenwanderung im Zervixmukus beteiligt ist, müssen alle Komponenten dieses Systems in den Genitalsekreten vorhanden sein.

Folgende Komponenten des Kininsystems konnten in den männlichen und weiblichen Genitalsekreten nachgewiesen werden:

- a.) kleine Mengen an Kininogen (Palm und Fritz, 1975; Palm et al., 1976)
- b.) Kininasen (Depierre und Roth, 1974; Palm und Fritz, 1975; Palm et al., 1976)
- c.) das Vorhandensein von kininfreisetzenden Enzymen konnte indirekt nachgewiesen werden. Falls ein kininfreisetzendes Enzym im Seminalplasma vorhanden ist, müssen bei Zusatz von biologisch aktivem, hochgereinigtem Kininogen, Kinine freigesetzt werden. Zugabe kleiner Mengen von hochgereinigtem Kininogen zu Spermaproben mit reduzierter Motilität bewirkte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Spermatozoenbeweglichkeit. Bei gleichzeitigem Zusatz von Trasylol oder Carboxypeptidase B konnte kein Effekt erzielt werden. Diese Ergebnisse sprechen für das Vorkommen einer kininfreisetzenden Proteinase im Seminalplasma (Schill und Preissler, 1977).

Es stellt sich nun die Frage nach der im Seminalplasma physiologischerweise vorkommenden kinin-freisetzenden Proteinase. Bavister (1974) beschrieb einen Faktor aus dem Akrosom von Hamsterspermatozoen, der die Spermatozoenmotilität im In vitro-Kapazitationssystem des Hamsters beträchtlich stimulierte. Säugertier-Spermatozoen enthalten im Akrosom eine trypsin-ähnliche Proteinase (Akrosin), die von Zaneveld et al., (1972) und Fritz et al. (1972) aus Humansperma isoliert und charakterisiert werden konnte. Es zeigte sich, daß Akrosin eine dem Kallikrein nahe verwandte Proteinase ist (Fritz et al., 1973; Palm und Fritz, 1975).

Zervixmucus wird durch proteolytische Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin) angedaut, was durch das Verschwinden des Farnkrautphänomens und die Veränderungen der rheologischen Eigenschaften (Viskositätsherabsetzung) sichtbar wird (Moghissi und Syner, 1970). Nakamura et al. (1975) konnten eine signifikante Minderung der Viskosität des Zervixmucus durch die Behandlung mit hochgereinigtem Akrosin nachweisen. Es ist denkbar, daß Akrosin aus sogenannten "Pionierspermatozoen" freigesetzt wird, die als Wegbereiter durch den Zervixmucus dienen, selbst aber ihre Befruchtungsfähigkeit verlieren und zugrunde gehen (Blandau, 1973). Durch die lokale Spaltung von Lysyl- und Arginylbindungen würde eine Herabsetzung der Viskosität

des Zervixmukus resultieren und damit die Penetration nachfolgender Spermatozoen begünstigt werden.

Schumacher und Zaneveld (1974) konnten durch Zusatz hoher Konzentrationen unterschiedlicher Akrosin-inhibitoren zum Sperma eine signifikante Hemmung der Zervixmukuspenetration im Kurzrock-Miller-Test beobachten. Diese experimentellen Befunde weisen auf die Beteiligung des Akrosins bei der Zervixmukuspenetration hin.

Da das Substrat Kininogen, aus dem Kinine freigesetzt werden, im Spermaplasma wie im Zervixmukus und wahrscheinlich auch im Uterus- und Tubensekret vorhanden ist (Palm et al., 1976), wäre es denkbar, daß Akrosin, welches aus degenerierten Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt freigesetzt wird, durch Kininlibrierung die Spermatozoenmotilität im Uterus stimuliert bzw. durch einen zusätzlichen Kinineffekt auf die glatte Muskulatur des Uterus den Spermatozoentransport begünstigt (Fritz et al., 1973).

Unsere Versuche, die mit Akrosin als Kininogenase durchgeführt wurden, zeigten, daß Akrosin, ähnlich wie Kallikrein, in der Lage ist, über eine Kininfreisetzung, die Penetrationsfähigkeit der Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus zu verbessern.

Es fehlt allerdings bisher noch der direkte Nachweis, daß Akrosin unter physiologischen Bedingungen Kinine freisetzt. Im Gegensatz zum weiblichen Genitaltrakt kommt eine Freisetzung von Kininen im männlichen Genitaltrakt bzw. im Seminalplasma durch Akrosin nicht in Frage, da in den männlichen Genitalsekreten hohe Konzentrationen an säurestabilen Akrosininhibitoren (HUSI II) vorliegen. Im weiblichen Genitaltrakt, vor allem im Zervixmukus werden beim Menschen keine niedermolekularen Akrosinhemmstoffe gefunden (Wallner und Fritz, 1974). Die nachgewiesenen hochmolekularen Serumproteinaseinhibitoren im Zervixmukus können ebenfalls nicht mit Akrosin interferieren, da diese zum Ovulationstermin nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden sind (Schumacher, 1973; Schumacher und Zaneveld, 1974).

Zwei Möglichkeiten der Kininfreisetzung durch Akrosin müssen diskutiert werden (Schill, 1976a):

- a.) die Spaltung von ubiquitär vorkommendem Kininogen durch Akrosin, das im weiblichen Genitaltrakt aus funktionsuntüchtigen oder degenerierten Spermatozoen freigesetzt wird.
- b.) eine Diffusion oder ein aktiver Transport von Kininogen in das Akrosom ist zumindest theoretisch vorstellbar. In diesem Falle käme es zur Kininfreisetzung innerhalb des Akrosoms (Selbststimulation).

Prinzipiell genügen Spuren von Akrosin, um aus wiederum extrem niedrigen Kininogenkonzentrationen Kinine freizusetzen. Die langsame Hemmung des Akrosins durch α_1 -Antitrypsin, das in geringen Konzentrationen in den uterinen Sekreten nachweisbar ist (Hirschhäuser et al., 1971; Schumacher, 1971; Stambaugh et al., 1974), dürfte nicht mit der Akrosinaktivität interferieren (Fritz et al., 1976).

Es wird angenommen, daß unter physiologischen Bedingungen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inaktivierung von Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems besteht. Eine Verschiebung dieser Homöostase führt dabei entweder zu einem Anstieg oder Abfall der Kininfreisetzung und damit zu einer Verbesserung oder Verschlechterung der Spermatozoenmotilität.

Cushman und Cheung (1971) wiesen hohe Spiegel einer Kininase II, des "angiotensin converting enzyme", in Hoden und Nebenhoden der Ratte nach, dagegen niedrige Kininasespiegel in dem Sekret der Bläschenrüsen, der Prostata und in den Sekreten des weiblichen Genitaltraktes. Auch beim Menschen konnte von Depierre und Roth (1974) Kininase II im Seminalplasma gefunden werden. Es ist naheliegend anzunehmen, daß die hohen Kininasespiegel im Hoden und Nebenhodenbe-

reich die Beweglichkeit der Spermatozoen während ihrer Reifung und Lagerung hemmen. Bei der Ejakulation wird der Kininasespiegel in der Umgebung der Spermatozoen stark herabgesetzt. Gleichzeitig setzt eine im Prostatasekret enthaltene Kininogenase Kinine frei und ist damit an der Sofortstimulation der Spermatozoenmotilität zusammen mit anderen Faktoren beteiligt. Ob diese Arbeitshypothese auch auf den Menschen übertragbar ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

Da somit eine herabgesetzte Spermatozoenmotilität durch eine Störung der Aktivierung und Inaktivierung von Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems bedingt sein könnte, könnte eventuell durch therapeutischen Einsatz von Kininen das verschobene Gleichgewicht zumindestens vorübergehend wiederhergestellt werden.

Obwohl Kinine die eigentlichen Wirksubstanzen darstellen, wird jedoch für den therapeutischen Einsatz infolge der Kurzlebigkeit der Kinine das Pankreasenzym Kallikrein empfohlen. In Anwesenheit von Kininogen setzt Kallikrein im Spermaplasma kontinuierlich das aus 10 Aminosäuren bestehende Kininpeptid Kallidin frei. Aus Kallidin entsteht dann durch eine Aminopeptidase Bradykinin. Der im Seminalplasma vorhandene Proteinaseninhibitor α_1 -Antitrypsin führt infolge außerordentlich geringer Konzentrationen

nicht zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität der Pankreasproteinase.

Kallikrein behält außerdem bei 4°C in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt über 2 Monate annähernd seine volle Aktivität. Selbst bei Lagerung im Kühlschrank von mehr als einem Jahr verliert Kallikrein nur 31 % seiner Aktivität. Im Gegensatz dazu ist das Enzym außerordentlich empfindlich gegenüber Temperaturen unter 0°C (Schill und Preissler, 1977).

Neben der systematischen Kallikreinanwendung zur Verbesserung der Spermatozoenmotilität bei Asthenozoospermie und zur Erhöhung der Spermatozoenzahl bei bestimmten Fällen von Oligozoospermie (Hofmann et al., 1975; Schill, 1975a; Schirren et al., 1975; Tauber et al., 1977) eröffnet der topische Zusatz der Proteinase zu Ejakulaten in Kombination mit der instrumentellen Insemination neue Ansatzpunkte in der Therapie der männlichen Subfertilität, vor allem dann, wenn diese durch motilitätsgestörte Spermatozoen bedingt ist.

Als Indikationen für den topischen Zusatz von Kallikrein zum Ejakulat sind therapieresistente Motilitätseinschränkungen leichten und mittleren Grades bei Astheno- und Oligozoospermie zu nennen, wobei durch die Kombination mit der instrumentellen Insemination

eine Begünstigung der Zervixmukuspenetration erreicht werden soll (Schill, 1975e; Wallner et al., 1975; Schill et al., 1976a).

Für die Praxis ist zu beachten, daß nur Plastikmaterial oder silikonisiertes Glas verwendet werden darf, um eine sofortige Inaktivierung der Kinine durch Glaskontakt zu vermeiden. Außerdem sollte vorher in einem In vitro-Stimulationstest geprüft werden, ob sich das Ejakulat des Probanden für eine Stimulation mit Kallikrein eignet, da Stimulationstests (Abb. 31) ergaben, daß nur bei der Hälfte der Proben eine verbesserte Spermatozoenmotilität durch den Kallikreinzusatz möglich war (Preissler und Schill, 1977).

Aufgrund der Untersuchungen von Schill et al. (1976b) konnten zwei Typen von Ejakulaten unterschieden werden, nämlich solche, die auf den Kallikreinzusatz mit einer Steigerung der Motilität reagieren und solche, bei denen der Zusatz von Kallikrein ohne Wirkung ist. Von 46 untersuchten Ejakulaten zeigten 63 % eine signifikante Steigerung der Spermatozoenmigration im Kremer-test mit einem durchschnittlichen Anstieg des Penetrationsindex von 89 % nach einer Inkubationszeit von 60 min. und um 81 % nach 120 min. Bei 37 % der Spermaproben führte Kallikrein zu keiner Stimulation der

IN VITRO STIMULIERBARKEIT DER SPERMATOZOENMOTILITÄT
Prozentuale Verteilung bei 57 Ejakulaten mit Hypokinese

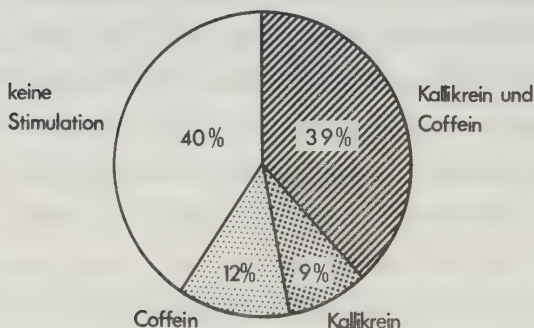


Abb. 31: In vitro-Stimulierbarkeit von 57 unausgewählten Ejakulaten (Asthenozoospermie, Oligoasthenozoospermie) durch Kallikrein und Coffein.
(siehe Preissler und Schill, 1977)

Spermatozoenpenetration. Ejakulate, bei denen die Spermatozoenbeweglichkeit durch Kallikrein nicht stimuliert werden konnte, enthielten wahrscheinlich bereits irreversibel geschädigte Spermatozoen. Auch ist denkbar, daß Kinine zu einem beschleunigten Zusammenbruch des Spermatozoenstoffwechsels führen können, wenn dieser bereits stark alteriert ist.

Ebenso müssen hohe Spiegel von kininabbauenden Enzymen oder ein Mangel an Kininogen im Seminalplasma diskutiert werden. Schließlich können natürlich auch andere Systeme als das Kallikrein-Kinin-System, die für die Regulation der Spermatozoenmotilität von Wichtigkeit sind, in ihrem dynamischen Gleichgewicht gestört sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß neben der systemischen Therapie die lokale Anwendung von Kallikrein bei Nativ- und Kryosperma in Kombination mit der instrumentellen Insemination über eine Anregung des Spermatozoenstoffwechsels zu einer Stimulation der Spermatozoenbeweglichkeit und, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, zu einer Steigerung des Zervixmukuspenetrationsvermögens führt. Der Einsatz von Pankreaskallikrein bietet somit neue Möglichkeiten, die Migration von Spermatozoen im Zervixmukus zu verbessern und damit die Konzeptionschancen eines subfertilen Ehepaares beim Vorliegen eines männlichen Sterilitätsfaktors zu erhöhen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops die Motilität menschlicher Spermatozoen im Nativpräparat sowie deren Penetrationsfähigkeit durch ovulatorischen Zervixmukus im Penetrationstest nach Kremer in Anwesenheit verschiedener Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems untersucht.

Zunächst wurde die Motilität der Spermatozoen nach Zusatz von Bradykinin in der Zählkammer bestimmt. Hierbei konnte bei Nativsperma durch 100 ng Bradykinin pro ml Sperma eine Motilitätssteigerung um circa 50 % erzielt werden.

Das Hauptgewicht der Arbeit wurde jedoch auf die Erhöhung des Penetrationsvermögens der Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus gelegt.

Durch Zugabe von Bradykinin im Nanogramm-Bereich konnte die Penetrationsfähigkeit seminalplasmafreier Spermatozoen im Zervixsekret um 50 bis 100 % gesteigert werden.

Die Proteinasen Kallikrein und Akrosin, die beide aus Kininogen Kinine freisetzen, führten ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Motilität und der Migration nativer und gewaschener Spermatozoen. Zusatz dieser Proteinasen in Kombination mit Kininogen erhöhte die Penetrationsdichte bis zu 150 %.

Durch ein kinininaktivierendes Enzym (Kininase) konnte die Wirkung der Kinine aufgehoben werden.

Kryokonservierte Spermatozoen wurden mit Kallikrein und Coffein stimuliert. Nach einer Beobachtungszeit von 60 min. konnte eine signifikante Verbesserung der Spermatozoenmotilität erzielt werden.

Schließlich wurde in orientierenden Untersuchungen der Einfluß von Coffein auf das Penetrationsverhalten von nativen Spermatozoen im ovulatorischen Zervixmukus geprüft. Auch hierbei konnte eine signifikante Steigerung der linearen Penetration und der Penetrationsdichte der Spermatozoen beobachtet werden.

Die vorliegenden Untersuchungen stellen die theoretische Basis für den topischen Zusatz von Kallikrein zum Sperma in Kombination mit der instrumentellen Insemination dar und eröffnen damit neue Ansatzpunkte in der Therapie der männlichen Subfertilität.

6. Literaturverzeichnis

Bavister, B.D. (1974) The effect of variations in culture conditions on the motility of hamster spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 38, 431-440.

Blandau, R.J. (1973) Sperm transport through the mammalian cervix: comparative aspects. In: The Biology of the Cervix (Blandau, R.J., K.S. Moghissi edits.), 285-304. Chicago: University of Chicago.

Casillas, E.R., D.D. Hoskins (1971) Adenyl cyclase activity and cyclic 3',5'-AMP content of ejaculated monkey spermatozoa. Arch. Biochem. 147, 148-155.

Cushman, D.W., H.S. Cheung (1971) Concentrations of angiotensin converting enzyme in tissues of the rat. Biochim. Biophys. Acta 250, 261-265.

Depierre, D., M. Roth (1974) Purification of angiotensin-converting enzyme from human seminal plasma. Experientia 30, 686.

Eisen, V. (1975) Some recent developments in kinin formation. In: Haberland, G.L., J.W. Rohen, G. Blümel,

P. Huber (Ed.): Kininogenases. Kallikrein 3. Physiological Properties and Pharmacological Rationale. Proliferation, Reparation and Function. (Schattauer: Stuttgart-New York) 3-9.

Erdös, E.G. (1970) Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. In: Eichler, O., A. Farah, H. Herken, A.D. Welch (Hrsg.): Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XXV. (Springer: Berlin-Heidelberg-New York)

Eskin, B.A., S. Azarbal, R. Sepic, W.G. Slate (1973) In-vitro responses of the spermatozoa-cervical mucus system treated with prostaglandin ($F_{2\alpha}$). Obstet. and Gynec. 41, 436-439.

Fjällbrant, B., D.R. Ackerman (1969) Cervical mucus penetration in vitro by fresh and frozen-preserved human semen specimens. J. Reprod. Fert. 20, 515-517.

Frey, E.K., H. Kraut, E. Werle (1968). Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. Enke: Stuttgart

Fritz, H., H. Schiessler, W.-D. Schleuning (1973) Proteinases and Proteinase Inhibitors in the fertilization process: new concepts of control? Advances in the Biosciences 10, 271-286.

Fritz, H., W.-D. Schleunig, H. Schiessler, W.-B. Schill, V. Wendt (1976) Seminal proteinase inhibitors and sperm acrosin: biochemistry and possible functions.

In: Hafez, E.S.E. (Ed.) Human Semen and Fertility Regulation in Men 201-216. Mosby St. Louis.

Fritz, H., B. Förg-Brey, E. Fink, M. Meier, H. Schiessler, C. Schirren (1972) Humanakrosin: Gewinnung und Eigenschaften. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1943-1945.

Garbers, D.L., W.D. Lust, N.L. First, H.A. Lardy (1971) Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. Biochemistry 10, 1825-1831.

Greenbaum, L.M., K. Yamafuji (1966) The role of cathepsins in the inactivation of plasma kinins. In: Erdős, E.G., N. Back, F. Sicuteri, A.F. Wilde (Ed.): Hypotensive peptides, Berlin, Springer-Verlag. S. 252-262.

Haberland, G.L., J.W. Rohen, G. Blümel, P. Huber (1975) Kininogenases. Kallikrein 3. Physiological Properties and Pharmacological Rationale. Proliferation, Reparation and Function. Schattauer: Stuttgart-New York.

Habermann, E. (1971) Gefäßaktive Peptide und Proteine.
In: Roka, L. (Hrsg.): Generalisierte intravaskuläre
Gerinnung, Beeinflussung der Hämostase durch gefäß-
aktive Pharmaka. 193-196 Schattauer: Stuttgart-New York.

Haesungcharern, A., M. Chulavatnatol (1973) Stimulation
of human spermatozoal motility by caffeine. Fertil.
Steril. 24, 662-665.

Hegner, D. (1968) Isolierung und Enzymbestand von
Granula aus polymorphkernigen Leukozyten des peri-
pheren Rinderbluts. Hoppe Seyler's Z. Physiol.
Chem. 349, 544-554.

Hicks, J.J., J. Martinez-Manautou, N. Pedron, A. Rosado
(1972) Metabolic changes in human spermatozoa related
to capacitation. Fertil. and Steril. 23, 172-179.

Hirschhäuser, C., M. Klonke, E. Daume, R. Buchholz
(1971) Trypsin inhibitors in the human female genital
tract. Acta Endocr. 68, 413-416.

Hofmann, N., A. Schönberger, H. Gall (1975) Unter-
suchungen zur Kallikrein-Behandlung männlicher Fer-
tilitätsstörungen. Z. Hautkr. 50, 1003-1012.

Hoskins, D.D., D.T. Stephens, E.R. Casillas (1971)
Enzymatic control of fructolysis in primate spermatozoa.
Biochim. biophys. Acta 237, 227-238.

Keller, D.W., K.L. Polakoski (1975) L-Arginine stimulation of human spermatozoa motility in vitro. Biol.Reprod. 13, 154-157.

Kienitz, Th., W.-B. Schill (1977) Orale Kallikrein-Therapie der Asthenozoospermie. Fortschritte der Medizin, 34, 2102-2105.

Kremer, J. (1965) A simple sperm penetration test. Int. J. Fertil. 10, 209-215.

Landerman, N.S., M.E. Webster, E.L. Becker, H.E. Ratcliffe (1962) Hereditary angioneurotic edema. II Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. J. Allergy 33, 316-329.

Leidl, W., R. Prinzen, W.-B. Schill, H. Fritz (1975) The effect of kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro. In: Kininogenases. Kallikrein 2 (Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber, edits.) 33-40. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Lindholmer, Ch. (1973) Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculates. Fertil. Steril. 24, 521-526.

Lunglmayr, G. (1976) Spermienmotilität unter Kallikrein. Wiener klin. Wschr. 88, 709-711.

Moghissi, K.S., F.N. Syner (1970) The effect of seminal protease on sperm migration through cervical mucus. Int. J. Fertil. 15, 43-49.

Nakamura, R.M., M. Saga, L.J.D. Zaneveld, G.F.B. Schumacher (1975) In Vorbereitung.

Oates, J.A., K. Melmon, K. Sjoerdsma, L. Gillespie, D.T. Mason (1964) Release of a kinin-peptide in carcinoid-syndrome. Lancet I, 514-517.

Palm, S., H. Fritz (1975) Components of the kallikrein-kinin-system in human midcycle cervical mucus and seminal plasma. In: Kininogenases. Kallikrein 2 (Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber, edits.) 17-21. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Palm, S., W.-B. Schill, O. Wallner, R. Prinzen, H. Fritz (1976) Occurrence of components of the kallikrein-kinin-system in human genital tract

secretions and their possible function in stimulation of sperm motility and migration. In: Sicuteri, F., N. Beck, G.L. Haberland (Ed.). *Advances of Experimental Medicine and Biology*, 271-279 Vol. 70: Kinins. Pharmacodynamics and Biological Roles. Plenum Press: New York.

Preissler, G., W.-B. Schill (1977) Der Einfluß von Kallikrein auf die Zervixmukuspenetration. *Fortschritte der Andrologie* 6, 88-100. Grosse Verlag.

Rixon, R.H., F. Whitfield (1973) Kallikrein, kinin and cell proliferation. In: Haberland, G.L., J.W. Rohen (Ed.): *Kininogenases. Kallikrein 1. Physiological Properties and Pharmacological Rationale*. 131-145. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Rixon, R.H., F. Whitfield, J. Bayliss (1971) The stimulation of mitotic activity in the thymus and bone marrow of rats by kallikrein. *Horm. Metab. Res.* 3, 279-283.

Rohen, J.W., I. Peterhoff (1973) Stimulation of mitotic activity by kallikrein in the gastrointestinal tract of rats. In: Haberland, G.L., J.W. Rohen, (Ed.): *Kininogenases. Kallikrein 1. Physiological Properties and Pharmacological Rationale*. 147-157. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Rohen, J.W., H. Buschhüter (1975) Karyometric measurement on the Sertoli cell nuclei in kallikrein-treated albino rats. In: Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber (Ed.): Kininogenases. Kallikrein 2. Physiological Properties and Pharmacological Rationale. 85-97
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Rohen, J.W., R. Stuttmann (1977) The early postnatal development of the germinative epithelium of the albino rat under the influence of kallikrein. In: Kininogenases. Kallikrein 4. Physiological Properties and Pharmacological Rationale. 217-223
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Sanyal, R.K., S.K. Khanna (1971) Action of cholinergic drugs on motility of spermatozoa. Fertil. and Steril. 22, 356-359.

Schill, W.-B. (1974a) Die Bedeutung der Cervix uteri für die Fertilität. Deutsche medizinische Wochenschrift 20, 1095-1098.

Schill, W.-B. (1974b) Acrosin activity of cryo-preserved human spermatozoa. Fertil. Steril. 26, 711-720.

Schill, W.-B. (1975a) Influence of kallikrein on sperm count and sperm motility in patients with infertility

problems. Preliminary results during oral and parenteral application with special reference to asthenozoospermia and oligozoospermia. In: Kininogenases. Kallikrein 2 (Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber, edits.) 129-146. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Schill, W.-B. (1975b) Influence of the kallikrein-kinin-system on human sperm motility in vitro. In: Kininogenases. Kallikrein 2 (Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber, edits.) 47-57. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Schill, W.-B. (1975c) Caffeine- and kallikrein-induced stimulation of human sperm motility. A comparative study. Andrologia 7, 229-236.

Schill, W.-B. (1975d) Increased fructolysis of kallikrein-stimulated human spermatozoa. Andrologia 7, 105-107.

Schill, W.-B. (1976a) Proteinasen und Proteinase-inhibitoren beim Menschen. Biochemie und Funktion des Akrosin und seiner Inhibitoren beim Fortpflanzungsvorgang mit besonderer Berücksichtigung der klinischen Bedeutung. In: Fortschritte der Andrologie (Schirren, C.) Vol. 5, 1-44.

Schill, W.-B. (1976b) Die Behandlung männlicher Fertilitätsstörungen mit Kallikrein. Deutsche medizinische Wochenschrift 48, 1773-1778.

Schill, W.-B. (1976c) Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Kallikrein und Coffein auf die Spermatozoenmotilität in vitro. In: Fortschritte der Fertilitätsforschung III. (Kaden, R., F. Lübbe, C. Schirren) 176-180. Grosse Verlag, Berlin.

Schill, W.-B. (1979) Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: results of a double-blind study. Archives of Andrology 2, 163-170.

Schill, W.-B. (1978) Erhöhung des cyclischen AMP-Spiegels der Spermatozoen durch Kallikrein.
In Vorbereitung.

Schill, W.-B., G.L. Haberland (1975) Wirkungen von verschiedenen Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Spermatozoenmotilität in vitro. Klinische Wochenschrift 53, 73-79.

Schill, W.-B., W. Pritsch (1976) Kinin-induced enhancement of sperm motility in cryo-preserved human spermatozoa. Proc. VIII Int. Congress Animal Reprod. Artif. Insemination, Cracow, Poland.

Schill, W.-B., G. Preissler (1977) Improvement of cervical mucus spermatozoal penetration by kinins- a possible therapeutical approach in the treatment of male subfertility. In: The Uterine Cervix in Reproduction. Insler, V., G. Bettendorf, edits. 134-145, Thieme Verlag, Stuttgart.

Schill, W.-B., O. Braun-Falco, G.L. Haberland (1974) The possible role of kinins in sperm motility. Int. J. Fertil. 19, 163-167.

Schill, W.-B., O. Wallner, S. Palm, H. Fritz (1976a) Kinin stimulation of spermatozoa motility and migration in cervical mucus. In: Human Semen and Fertility Regulation in Man. (Hafez, E.S.E., edit.) 442-451. Mosby Comp. St. Louis. Miss.

Schill, W.-B., A. Grösser, G. Preissler, O. Wallner (1976b) In vitro stimulation of cervical mucus sperm penetration by components of the kallikrein-kinin-system. In: Ludwig, H., P.F. Tauber (Ed.): Human Fertilization, International Workshop Essen, 106-113, Thieme Verlag, Stuttgart.

Schirren, C. (1975) Experimental studies on the influence of kallikrein on the human sperm motility in vitro. In: Kininogenases. Kallikrein 2 (Haberland, G.L.,

J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber, edits.) 59-61.

Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Schirren, C., W.-B. Schill, N. Hofmann (1975) The influence of kallikrein on semen parameters of sub-fertile patients. In: Kininogenases. Kallikrein 2 (Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber, edits.) 111-127. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Schoenfeld, C., R.D. Amelar, L. Dubin (1973) Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. A preliminary report. Fertil. Steril. 24, 772-775.

Schumacher, G.F.B. (1971) Alpha₁-antitrypsin in uterine secretions. In: Fritz, H. and H. Tschesche Proc. Int. Res. Conf. Proteinase Inhibitors, Munich 1970. 253-256. Walter de Gruyter, Berlin-New York.

Schumacher, G.F.B. (1973) Soluble proteins of human cervical mucus. In: Elstein, M., K.S. Moghissi, R. Borth; Cervical Mucus in Human Reproduction. 93-113. Scriptor Copenhagen.

Schumacher, G.F.B., L.J.D. Zaneveld (1974) Proteinase inhibitors in human cervical mucus and their in vivo interaction with human acrosin. In: Fritz, H., H. Tschesche, L.J. Greene, E. Truscheit, Bayer-Symposium

V, Proteinase Inhibitors. 178-186. Springer Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York.

Shah, G.V., A.R. Sheth, P.P. Mugatwala, S.S. Rao
(1976) Effect of spermine on adenyl cyclase activity
of spermatozoa. *Experientia* 31, 631-632.

Scambaugh, R., H.M. Seitz, L. Mastroianni (1974)
Acrosomal proteinase inhibitors in rhesus monkey
(*Macaca mulatta*) oviduct fluid. *Fertil. Steril.*
25, 352-357.

Steiner, R., N. Hofmann, R. Kaufmann, R. Hartmann
(1977) The influence of kallikrein on the velocity of
human spermatozoa measured by Laser-Doppler-spectroscopy.
In: *Kininogenases. Kallikrein 4* (Haberland, G.L.,
J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber edits.) 229-235.
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Stüttgen, G. (1973) Clinical substantiation of the
effects of kallikrein. In: *Kininogenases. Kallikrein 1*
(Haberland, G.L., J.W. Rohen, edits.) 189-193.
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Tash, J.S., T. Mann (1973a) Relation of cyclic AMP
to sperm motility. *J. Reprod. Fertil.* 35, 591.

Tash, J.S., T. Mann (1973b) Adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in relation to motility and senescence of spermatozoa. *Proc. roy. Soc. B* 184, 109-114.

Tauber, P.F., E. Kurz, D. Propping (1977) Effect of kallikrein treatment on human seminal plasma. *Fertil. Steril.* 28, 385.

Ulstein, M. (1973) Fertility of donors at heterologous insemination. *Acta obstet. gynec. scand.* 52, 97-101.

Wallner, O., H. Fritz (1974) Characterization of an acid-stable proteinase inhibitor in human cervical mucus. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 709-715.

Wallner, O., W.-B. Schill, A. Grösser, H. Fritz (1975) Participation of the kallikrein-kinin-system in sperm penetration through cervical mucus - in vitro studies. In: *Kininogenases. Kallikrein 2* (Haberland, G.L., J.W. Rohen, C. Schirren, P. Huber, edits.) 63-70. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.

Zaneveld, L.J.D., P.N. Srivastava, W.L. Williams (1969) Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation. *J. Reprod. Fert.* 20, 337-339.

Zaneveld, L.J.D., B.M. Dragoje, G.F.B. Schumacher
(1972) Acrosomal proteinase and proteinase inhibitor
of human spermatozoa. Science 177, 702-703.

Abschließend möchte ich Herrn Privatdozent Dr. med. W.-B. Schill für die Überlassung des Themas und die außerordentlich hilfsbereite Beratung bei der Durchführung der Arbeit recht herzlich danken.

Für die Bereitstellung von ovulatorischem Zervixmucus bin ich Herrn Dr. M. Littich, München, Herrn Dr. O. Wallner und Priv.-Doz. Dr. R. Goebel, I. Universitätsfrauenklinik, sehr dankbar.

Danken möchte ich auch Frau Dr. B. Dittmann und Herrn Dr. W.P. Müller, Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie in der chirurgischen Universitätsklinik München, die mir hochgereinigtes Rinderkininogen und Eberakrosin zur Verfügung stellten.

Schließlich sei den medizinisch-technischen Assistentinnen der andrologischen Abteilung an der Dermatologischen Klinik der Universität München gedankt, die mir in allen technischen Belangen unterstützend zur Seite standen.

Lebenslauf

Am 21. März 1953 wurde ich als Sohn des Arztes für Allgemeinmedizin Dr. Werner Preissler und seiner Ehefrau Erna, geb. Baumann, in München geboren. Nach der Volksschule besuchte ich das Ludwigsgymnasium in München, an dem ich im Sommer 1972 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1972/73 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach erfolgreichem Ablegen der ärztlichen Prüfung wurde mir am 6. November 1978 die Approbation als Arzt erteilt. Seit 1. Dezember 1978 bin ich als Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Pfaffenhofen/Ilm tätig.

